



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Emulsões estabilizadas por colágeno: efeito da hidrólise
térmica e do processo de homogeneização**

Rejane de Castro Santana

Engenheira de Alimentos, 2007 (UFV)

Prof.^a Dr.^a Rosiane Lopes da Cunha

Orientadora

Dissertação apresentada à comissão de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Campinas, agosto de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Santana, Rejane de Castro
Sa59e Emulsões estabilizadas por colágeno: efeito da hidrólise térmica e
do processo de homogeneização / Rejane de castro Santana. --
Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Rosiane Lopes da Cunha
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Colágeno. 2. Hidrólise térmica. 3. Emulsões. 4. Reologia.
5. Estabilidade. I. Cunha, Rosiane Lopes da. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Emulsions stabilized by collagen: effect of thermal hydrolysis and
emulsification process

Palavras-chave em inglês (Keywords): Collagen, Thermal hydrolysis, Emulsion, Rheology,
Stability

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Rosiane Lopes da Cunha
Angelo Luiz Fazani Cavallieri
Florência Cecília Menegalli

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha
Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos –
UNICAMP
Orientadora

Prof. Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri
Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos – UFG
Membro

Profa. Dra. Florência Cecília Menegalli
Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos –
UNICAMP
Membro

**Aos meus pais, pelo incentivo e apoio
incondicional.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por todas minhas realizações.

Aos meus pais, Romeu e Elisa. Obrigada por vibrarem a cada conquista, pela confiança, amor e exemplo de vida.

Aos meus irmãos, Cristiane e Romeu V., e sobrinhas, Aline e Júlia, pela torcida, carinho e alegria.

À Profa Dra Rosiane Lopes da Cunha, pela disponibilidade, orientações, constante estímulo e paciência.

Ao César, pelo amor e companheirismo.

À UNICAMP, funcionários e professores, que viabilizaram a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À NovaProm Food Ingredients (Lins-SP), pela fornecimento do colágeno.

À banca examinadora, pelas valiosas correções e sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao Prof Dr. Francisco Maugeri Filho, que disponibilizou o microscópio para complementação desta tese.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Processos, pelas ajudas e agradável ambiente de trabalho. Em especial à Aninha, Fabi, Luiz e Ângelo que me ampararam no laboratório, nas dúvidas e sugestões.

Aos demais colegas de pós do Dea, Rosana, Juliana, Elen, Margarita, Lorena, Kátia, Carol e Vanessa, pelos bons momentos em Campinas.

À Fernanda, ao Felipe e ao Murilo, pela amizade sempre presente neste período

A todos que participaram de minha vida e contribuíram por esta conquista.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMO GERAL	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1. Introdução	3
1.2. Objetivos	4
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Emulsões	7
2.2. Métodos de emulsificação	9
2.2.1. Homogeneização a alta pressão	9
2.3. Colágeno	10
2.3.1. Estrutura e composição	11
2.3.2. Propriedades emulsificantes do colágeno	14
2.4. Propriedades reológicas	16
2.4.1. Curvas de escoamento	17
2.4.2. Reologia oscilatória	20
CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Material	23
3.2. Métodos	23
3.2.1. Preparo da fibra de colágeno parcialmente hidrolisada	25
3.2.2. Análises do colágeno parcialmente hidrolisado	26
3.2.2.1. Determinação do ponto isoelétrico	26
3.2.2.2. Calorimetria diferencial de varredura	26
3.2.2.3. Solubilidade da fibra de colágeno	27
3.2.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
3.2.3. Preparo das Emulsões	28
3.2.3.1. Preparo das dispersões de colágeno	28
3.2.3.2. Processo de homogeneização	29
3.2.4. Análises das emulsões	30
3.2.4.1. Estabilidade	30
3.2.4.2. Caracterização química das fases	30
3.2.4.3. Caracterização microscópica e tamanho de gotas	31
3.2.4.4. Medidas Reológicas	32
3.2.5. Análises Estatísticas	33
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
Parte 1. Emulsões estabilizadas por colágeno na forma de fibra não hidrolisada e de pó	35
4.1. Macro-emulsões	37

4.1.1. Estabilidade	37
4.1.2 Tamanho e distribuição de tamanho de gotas	41
4.2. Micro-emulsões	46
4.2.1. Estabilidade	46
4.2.2. Tamanho e distribuição de tamanho de gotas	47
4.2.3. Reologia.....	53
Parte 2. Propriedades físico-químicas da fibra de colágeno não hidrolisado e da fibra de colágeno parcialmente hidrolisada	63
4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida	65
4.4. Solubilidade.....	67
4.5. Calorimetria.....	70
Parte 3. Emulsões estabilizadas por fibra de colágeno parcialmente hidrolisada	73
4.6. Macro-emulsões	75
4.6.1. Efeito da hidrólise térmica do colágeno e do pH.....	75
4.6.1.1. Estabilidade	75
4.6.1.2. Composição química das fases	77
4.6.1.3. Tamanho e distribuição de tamanho de gota.....	80
4.6.2. Efeito do conteúdo de fração solúvel de colágeno hidrolisado.....	82
4.6.2.1 Estabilidade	83
4.7. Micro-emulsões	86
4.7.1. Índice de cremeação	86
4.7.2. Diâmetro e distribuição do tamanho de gotas.....	87
4.7.3. Reologia.....	91
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS.....	99
CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição de aminoácidos (g/100g de proteína) da fibra de colágeno (Fonte: Wolf et al., 2009).....	13
Tabela 2.2. Taxas de deformação típicas observadas em alguns processos relevantes em alimentos.	19
Tabela 3.1. Análises realizadas nas emulsões estabilizadas por colágeno não hidrolisado.	24
Tabela 3.2. Representação esquemática das análises realizadas nas emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado.....	25
Tabela 4.1. Índice de cremeação das emulsões estabilizadas por fibra de colágeno mensurado pelo volume da fase inferior em relação ao volume total (% v/v).....	38
Tabela 4.2. Índice de cremeação das emulsões estabilizadas por pó de colágeno mensurado pelo volume da fase inferior em relação ao volume total (% v/v).....	39
Tabela 4.3. Tamanho de gota d_{32} (μm) das emulsões estabilizadas por fibra de colágeno.....	42
Tabela 4.4. Tamanho de gota d_{32} (μm) das emulsões estabilizadas por pó de colágeno.	42
Tabela 4.5. Diâmetro médio (d_{32}) e mediana do tamanho de gotas das microemulsões estabilizadas por 0,5 % (m/m) de fibra de colágeno não hidrolisada.	49
Tabela 4.6. Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') obtidos em frequência de 1 Hz em ensaios oscilatórios de emulsões estabilizadas por fibra de colágeno não hidrolisada e homogeneizadas a alta pressão.....	60
Tabela 4.7. Coeficiente n obtido pelo ajuste da lei da potência aos log de G' e G'' em função do log da frequência, em ensaios realizados em emulsões estabilizadas por fibra de colágeno não hidrolisada e homogeneizadas a alta pressão.....	61
Tabela 4.8. Temperatura de desnaturação (T_{desn}), temperatura de início de desnaturação (T_{onset}) e entalpia (ΔH) da fibra de colágeno não hidrolisada e parcialmente hidrolisada.	71
Tabela 4.9. Índice de cremeação (%v/v) e tempo para início de visualização da separação de fases das emulsões estabilizadas por 1 % m/m de fibra de colágeno parcialmente hidrolisado.	77
4.6.1.2. Composição química das fases	77
Tabela 4.10. Composição química das fases separadas após 7 dias de estocagem das emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado em pH 3,5 e pH 9,2.	79
4.6.1.3. Tamanho e distribuição de tamanho de gota.....	80
Tabela 4.11. Diâmetro de gota d_{32} (μm) das emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado em pH 3,5.	80
Tabela 4.12. Diâmetro médio de gota (d_{32}) e mediana do diâmetro em função da pressão de homogeneização e da hidrólise parcial do colágeno.....	88
Tabela 4.13. Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em frequência fixa de 1 Hz de emulsões estabilizadas por 0,5% (m/m) de colágeno parcialmente hidrolisado.....	97
Tabela 4.14. Constante n obtida pelo ajuste da lei da frequência aos dados de G' e G'' em função da frequência, em emulsões estabilizadas por 0,5% (m/m) de colágeno parcialmente hidrolisado.	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura química do colágeno tipo I. (a) Sequência primária de aminoácidos, (b) estrutura secundária e terciária e (c) estrutura quaternária (Fonte: Friess, 1998).	12
Figura 2.2. Curvas de escoamento para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos independentes do tempo.	18
Figura 3.1. Representação esquemática do processo de hidrólise térmica da fibra de colágeno e avaliação do material obtido.....	23
Figura 4.1. Efeito do pH e da concentração de proteína no índice de cremeação (IC) das emulsões estabilizadas por fibra de colágeno. Conteúdo de proteína: (●) 0,5 % (m/m), (■) 1 % (m/m), (*) 2 % (m/m), (▲) 3 % (m/m).	38
Figura 4.2. Efeito do pH e da concentração de proteína no índice de cremeação (IC) das emulsões estabilizadas por pó de colágeno. Conteúdo de proteína: (●) 1 % (m/m), (■) 2 % (m/m), (*) 3 % (m/m), (▲) 4 % (m/m).	39
Figura 4.3. Micrografia das emulsões O/A com pó de colágeno e 10 % (m/m) de óleo. Barra da escala = 50µm.....	44
Figura 4.4. Micrografia das emulsões O/A com fibra de colágeno e 10 % (m/m) de óleo. Barra da escala = 50µm.....	45
Figura 4.5. Separação de fases das emulsões após 7 dias de estocagem. A) emulsão homogeneizada a 200 bar/1 passagem e B) emulsão homogeneizada a 1000 bar/2 passagens.	47
Figura 4.6. Aparência da emulsão homogeneizada a 200 bar /1 passagem.	47
Figura 4.7. Micrografia das emulsões O/A com 0,5 % de proteína de fibra de colágeno. Barra da escala = 10 µm.....	48
Figura 4.8. Tamanho médio de gota d_{32} em função do processo de homogeneização. Número de passagens no homogeneizador: (▲) 1 passagem e (Δ) 2 passagens.....	50
Figura 4.9. Evolução da distribuição do diâmetro de gota em função da pressão de homogeneização. Pressão (bar): (—) 1000, (■ ■ ■) 800, (■ ■ ■) 600, (■ ■ ■) 400 e (■ ■ ■) 200. Número de passagens pelo homogeneizador: (A) 1 passagem e (B) 2 passagens.	51
Figura 4.10. Efeito da pressão de homogeneização na temperatura da emulsão na saída do homogeneizador. Número de passagens pelo homogeneizador: ●: 1 passagem, ■: 2 passagens.	53
Figura 4.11. Efeito da pressão de homogeneização nas curvas de escoamento das emulsões compostas por 0,5% m/m de proteína de fibra de colágeno e 10% (m/m) de óleo de soja. Pressão de homogeneização (bar): 200 (□), 400 (-), 600 (Δ), 800 (o) e 1000 (◇). Número de passagens pelo homogeneizador: (A) 1 passagem e (B) 2 passagens.....	54
Figura 4.12. Parâmetros ajustado pelo modelo HB e viscosidade aparente a 100 s^{-1} . ■: 1 passagem pelo homogeneizador, ■: 2 passagens pelo homogeneizador. Letras minúsculas diferentes em cada pressão de homogeneização e letras maiúsculas diferentes em emulsões com mesmo número	

de passagens pelo homogeneizador indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$).....	55
Figura 4.13. Efeito da pressão de homogeneização na viscosidade aparente das emulsões. Pressão: 200 (□), 400 (○), 600 (Δ), 800 (◇), 1000 bar (-). Número de passagens pelo homogeneizador: (A) 1 passagem e (B) 2 passagens.....	57
Figura 4.14. Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento típico das emulsões homogeneizadas a alta pressão. Módulo elástico G' (◆) e módulo viscoso G'' (◇).....	58
Figura 4.15. Influência da pressão de homogeneização e número de passagens no módulo complexo (G^*) das emulsões compostas por 0,5% m/m de proteína e 10 % (m/m) de óleo. Pressão: 200 (◇), 400 (□), 600 (○), 800 (Δ) e 1000 bar (-). Número de passagens pelo homogeneizador: (A) 1 passagem e (B) 2 passagens.....	59
Figura 4.16. Eletroforese SDS-PAGE da fração insolúvel da fibra de colágeno não hidrolisada e parcialmente hidrolisada. (1) marcador molar, (2) colágeno não hidrolisado, colágeno hidrolisado (3) 50°C/20min, (4) 50°C/60min, (5) 65°C/20min, (6) 65°C/60min, (7) 85°C/20min e (8) 85°C/60min.....	66
Figura 4.17. Eletroforese SDS-PAGE da fração solúvel da fibra de colágeno não hidrolisada e parcialmente hidrolisado. (1) marcador molar, (2) colágeno não hidrolisado, colágeno hidrolisado (3) 50°C/20min, (4) 50°C/60min, (5) 65°C/20min, (6) 65°C/60min, (7) 85°C/20min e (8) 85°C/60min.....	66
Figura 4.18. Efeitos dos tratamentos térmicos na composição de proteína solúvel (■) e insolúvel (■). 67	
Figura 4.19. Variação da solubilidade do colágeno em função do pH e dos tratamentos térmicos. Tratamentos: (◆) fibra não hidrolisada, (●) 50°C/20min, (▲) 65°C/20min e (■) 85°C/60min.	69
Figura 4.20. Ponto isoelétrico identificado para a fibra de colágeno não hidrolisada e fibra parcialmente hidrolisada.	69
Figura 4.21. Curvas de desnaturação da fibra de colágeno. Amostras: (◆) pó de colágeno, (x) fibra não hidrolisada, hidrolisados (●) 50°C/20min, (○) 50°C/60min, (■) 65°C/20min, (□) 65°C/60min, (▲) 85°C/20min, (Δ) 85°C/60min.	71
Figura 4.22. Aparência das emulsões sem adição de emulsificantes (1) e estabilizadas por 1%(m/m) de fibra parcialmente hidrolisada em pH 3,5 (2) e pH 9,2 (3). Tratamentos: (A) 50°C/20min, (B) 50°C/60min, (C) 65°C/20min, (D) 65°C/60min, (E) 85°C/20min e (F) 85°C/60min.	76
Figura 4.23. Microscopias das emulsões O/A estabilizadas por 1% (m/m) de proteína de fibra de colágeno parcialmente hidrolisada em pH 3,5 e 9,2. Barra de escala = 50μm.....	81
Figura 4.25. Emulsões estabilizadas por diferentes frações de proteína solúvel de colágeno parcialmente hidrolisado. Fração de proteína solúvel (1) 0%, (2) 20%, (3) 40%, (4) 60%, (5) 80% e (6) 100%.....	83
Figura 4.26. Índices de cremeação obtidos em emulsões estabilizadas por 1% (m/m) de fibra de colágeno em diferentes frações de proteína solúvel. Tratamentos: Não hidrolisada (x), 50°C/20min (Δ), 50°C/60min (▲), 65°C/20min (□), 65°C/60min (■), 85°C/20min (○) e 85°C/60min (●).....	84

Figura 4.27. Tempo mínimo para início da visualização da separação de fases em emulsões estabilizadas por 1% (m/m) de fibra de colágeno em diferentes frações de proteína solúvel. Tratamentos: não hidrolisada (x), 50°C/20min (Δ), 50°C/60min (▲), 65°C/20min (□), 65°C/60min (■), 85°C/20min (o) e 85°C/60min (●).	85
Figura 4.28. Separação de fases das emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado a 65°C/20min. Pressão de homogeneização: A) 200 bar e B) 600 bar.	86
Figura 4.29. Micrografia das emulsões O/A compostas por 0,5 % (m/m) de fibra de colágeno não hidrolisada e parcialmente hidrolisada. Barra da escala = 10 μm.	89
Figura 4.30. Distribuição do diâmetro de gota em emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado. Tratamentos: () colágeno não hidrolisado, () 50°C/20min, () 50°C/60min, () 65°C/20min, () 65°C/60min, () 85°C/20min, () 85°C/60min. Pressão de homogeneização: (A) 200 bar, (B) 600 bar e (C) 1000 bar.	90
Figura 4.31. Evolução da constante m com o processo de hidrólise.	91
Figura 4.32. Curvas de escoamento das emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado. Tratamentos: (♦) não hidrolisado, (□)50°C/20min, (■) 50°C/60min, (Δ) 65°C/20min, (▲) 65°C/60min, (+) 85°C/20min, (-) 85°C/60min. Pressão de homogeneização: (A) 200 bar, (B) 600bar e (C) 1000 bar.	92
Figura 4.33. Viscosidade aparente a 100 s ⁻¹ das emulsões estabilizadas por 0,5% (m/m) de colágeno parcialmente hidrolisado. Pressão de homogeneização: (■) 200 bar, (■) 600 bar, (⊞) 1000 bar.	93
Figura 4.34. Parâmetros ajustado pelo modelo Herschel-Bulkley. ■: 200 bar, ■: 600 bar, ⊞: 1000 bar. Diferentes letras minúsculas e maiúsculas indicam que os valores diferem significativamente (p<0,05) em cada tratamento térmico e pressão de homogeneização, respectivamente.	94
Figura 4.35. Módulo complexo. Tratamentos: (-) não hidrolisado, (□)50°C/20min, (o) 50°C/60min, (◇) 65°C/20min, (Δ) 65°C/60min, (x) 85°C/20min, (+) 85°C/60min. Pressão de homogeneização: (A) 200 bar, (B) 600bar e (C) 1000 bar.	96

RESUMO GERAL

O colágeno é uma proteína de origem animal de grande disponibilidade no Brasil e com aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética na forma de gelatina. Com o intuito de entender e melhorar as propriedades emulsificantes de ingredientes à base de colágeno extraído do couro bovino, as propriedades físico-químicas da fibra de colágeno foram inicialmente avaliadas e modificadas através da hidrólise parcial em temperaturas de 50 à 85°C por períodos de 20 e 60 minutos. O processo de hidrólise aumentou a solubilidade do colágeno de 2,9 % (m/m) para 33,0 % (m/m) e produziu frações de menor massa molar, que chegaram a alcançar 37 kDa no hidrolisado a 85°C/60min. A temperatura de desnaturação do colágeno encontrou-se em torno de 64°C, sendo que os tratamentos a 65°C e 85°C foram capazes de desnaturar totalmente a fibra de colágeno. Já as propriedades emulsificantes do colágeno foram avaliadas através da estabilidade, microestrutura e reologia de emulsões simples óleo/água (O/A) estabilizadas por colágeno, verificando a influência do pH, tipo de ingrediente (pó e fibra de colágeno), concentração de proteína, hidrólise térmica do colágeno, conteúdo de proteína solúvel e processo de homogeneização. A estabilidade estérica e eletrostática das macro-emulsões aumentou com a concentração de proteína e com a redução do pH, respectivamente, sendo obtidas macro-emulsões estáveis, sem separação de fases, em sistemas ajustados para pH 3,5 e estabilizados por 0,5% (m/m) de fibra de colágeno não hidrolisada ou 3,0% (m/m) de pó de colágeno. Já as macro-emulsões estabilizadas por 0,5% (m/m) de fibra de colágeno parcialmente hidrolisado apresentaram separação de fases, sendo que parte da proteína solúvel produzida na hidrólise se deslocou para a fase aquosa, indicando que o processo de hidrólise diminuiu a capacidade da proteína de se ligar ao óleo. A hidrólise reduziu o conteúdo de proteína insolúvel responsável pela estabilização estérica, além de deslocar o ponto isoelétrico do

hidrolisado de 8,8 para uma faixa de 7,4 a 4,5, diminuindo a capacidade de estabilização eletrostática do colágeno. As micro-emulsões homogeneizadas a altas pressões apresentaram-se mais estáveis, com gotas de menor polidispersão e diâmetro médio superficial entre 0,98 a 5,13 μm , cerca de seis vezes menor que aquelas observadas nas macro-emulsões. A viscosidade e elasticidade das micro-emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado diminuíram com o aumento da hidrólise do colágeno e da pressão de homogeneização, já que tais processos romperam a fibra de colágeno e a gota, deixando as micro-emulsões menos estruturadas. De maneira geral, foi possível a produção de emulsões ácidas estáveis a partir do colágeno, seja através da homogeneização em Ultra-Turrax ou em altas pressões, cada processo originando emulsões com estruturas e propriedades reológicas características.

Palavras-chave: colágeno, hidrólise térmica, emulsões, reologia, estabilidade, microestrutura.

ABSTRACT

Collagen is a protein derived from animal source with high availability in Brazil and some applications in food, cosmetics and pharmaceutical industries. To understand and improve the emulsifying properties of the collagen derived from bovine hide, the physicochemical characteristics of collagen fibers was initially determined and modified through thermal hydrolysis at temperatures ranging from 50 to 85°C for periods of 20 and 60 minutes. The hydrolysis process increased the protein solubility from 2.9% (w/w) to 33.0% (w/w) and the amount of molecules of low molecular mass, led to values until 37 kDa for the hydrolysates at 85°C/60min. It was verified that hydrolysis at 65°C and 85°C denaturated the collagen fiber, once the denaturation temperature of collagen fibers is around 64°C. Emulsifying properties of collagen was also studied on the effects of the pH, type of ingredient, protein concentration, thermal hydrolysis of the collagen, soluble protein content and emulsification process. The stability, microstructure and rheology of oil-in-water emulsions stabilized by collagen were evaluated. The results showed that the steric and electrostatic stability of macro-emulsions increased with the protein concentration and the reduction of pH, respectively, promoting the formation of stable macro-emulsions, without phase separation, at pH 3.5 and stabilized by 0.5% (w/w) collagen fibers or 3.0% (w/w) collagen powder. However, the macro-emulsions stabilized by 0.5% (w/w) hydrolysed collagen fiber showed phase separation. Part of the soluble protein produced in hydrolysis migrated to the aqueous phase, indicating that the hydrolysis process reduced the interaction between protein and oil. The hydrolysis decreased the insoluble protein content responsible by the structural stability of the emulsions and changed the isoelectric point of the collagen from 8.8 to a range of 7.4 to 4.5, decreasing the capacity

of electrostatic stabilization of collagen. The micro-emulsions emulsified by high-pressure was composed by droplets with low dispersion and small mean diameter (between 0.98 and 5.13 μm), six times lower than those observed values in the macro-emulsions. The increase of the pressure and the hydrolysis process in the micro-emulsion stabilised by hydrolyzed collagen leads to a reduction in the viscosity and elasticity of the micro-emulsion stabilised by hydrolyzed collagen, probably attributed to the break of the droplets and collagen fiber in the valve pressure. Finally, it can be estimated the production of acid emulsions stabilized by collagen, high pressure, being theirs structure and rheological properties different.

Keywords: collagen, thermal hydrolysis, emulsion, rheology, stability, microstructure.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

As emulsões estão presentes em uma ampla variedade de produtos alimentícios, como o leite, iogurte, maionese, sorvete, margarina e produtos cárneos. A diversidade de características sensoriais e físico-químicas apresentadas por estes produtos é resultado dos diferentes tipos de ingredientes e condições de processamento utilizadas. Entretanto, as emulsões possuem características de elevada instabilidade, podendo acarretar a separação de seus componentes em fases distintas. Proteínas e polissacarídeos são os dois biopolímeros funcionais mais importantes utilizados como ingredientes em emulsões alimentícias (DICKINSON, 2003), devido à sua habilidade para controlar a textura, estrutura, e estabilidade. Estes compostos são considerados aditivos seguros e constituem uma alternativa aos emulsificantes artificiais, que vem encontrando extrema rejeição ao uso nas legislações dos principais mercados mundiais (CHEN et al., 2006).

As proteínas podem ser usadas como emulsificantes devido à sua habilidade de melhorar a estabilidade e fornecer propriedades físico-químicas desejáveis para as emulsões (DICKINSON, 2003). O colágeno é a proteína mais abundante em vertebrados e está presente principalmente nos ossos, pele e tendões. Seu uso industrial é de especial interesse devido a grande disponibilidade desta matéria-prima no Brasil, um dos grandes produtores mundiais de gado bovino (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2002). Apesar do crescente uso desta proteína em materiais biomédicos e cosméticos e do tradicional uso industrial na produção de gelatina, existe uma escassez de estudos quanto às propriedades de emulsões estabilizadas por colágeno não hidrolisado ou parcialmente hidrolisado. Além de ser um material de origem natural, propriedades como retenção de água e capacidade de formação de géis podem, juntamente com o efeito emulsificante, tornar o colágeno atrativo como um

ingrediente alimentar.

A homogeneização a altas pressões é um processo de emulsificação que viabiliza a produção de emulsões com reduzido tamanho de gota e maior estabilidade (MCCLEMENTS, 2005). Desta maneira, o uso de novas tecnologias e ingredientes estabilizantes/emulsificantes podem viabilizar a produção de emulsões com diferenciadas propriedades físico-químicas e organolépticas, como textura, sabor e aparência.

1.2. Objetivos

O objetivo principal deste projeto foi estudar emulsões O/A estabilizadas por pó de colágeno, fibra de colágeno não hidrolisada e fibra de colágeno parcialmente hidrolisada termicamente. Com este intuito, os objetivos específicos da pesquisa foram:

- Analisar a influência da hidrólise térmica da fibra de colágeno, nas condições de aquecimento a 50, 65 e 85°C por períodos de 20 e 60 minutos, em suas propriedades físico-químicas e funcionais, em especial suas propriedades emulsificantes/estabilizantes;
- Preparar emulsões O/A estabilizadas por colágeno e verificar a influência do pH, tipo de ingrediente, concentração de proteína, hidrólise térmica do colágeno e conteúdo de proteína solúvel nas propriedades reológicas, tamanho de gotas e estabilidade das emulsões.
- Avaliar os efeitos dos processos de homogeneização primária e secundária na estabilidade, estrutura e propriedades reológicas das emulsões.

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Emulsões

As emulsões são constituídas por dois líquidos imiscíveis, sendo que um dos líquidos encontra-se disperso no outro na forma de pequenas gotas esféricas. As emulsões podem ser classificadas de acordo com a distribuição relativa das diferentes fases. Um sistema que consiste de gotas de óleo dispersas em uma fase contínua aquosa é chamado de emulsão óleo em água (O/A), que é o caso do leite e maionese; enquanto que um sistema formado por gotas de água dispersas em uma fase oleosa é chamado emulsão água em óleo (A/O), tendo como exemplos a margarina e a manteiga (MCCLEMENTS, 2005).

As emulsões são termodinamicamente instáveis, já que a energia livre de formação da emulsão é maior que zero: $\Delta G_f > 0$. O termo de energia interfacial $\gamma \Delta \cdot A$ é elevado e positivo, se sobressaindo sobre a entropia de formação das gotas $T \cdot \Delta S_f$, também positivo (Equação 1). Desta maneira, a emulsão tende a se estabilizar termodinamicamente com a minimização da área interfacial entre as duas fases imiscíveis, coalescendo as gotas e favorecendo a separação de fases (ANTON et al., 2008).

$$\Delta G_f = \gamma \Delta \cdot A - T \cdot \Delta S_f \quad (1)$$

onde ΔG_f é a energia livre de formação, $\gamma \Delta$ tensão interfacial, A área superficial, T temperatura, ΔS_f entropia de formação.

Desta forma, é importante conhecer o processo de estabilização cinética, a taxa que ocorre a separação de fases e os meios de retardá-la, garantindo que os produtos tenham as características desejáveis por um período suficientemente longo. Durante o processo de desestabilização cinética de emulsões O/A acontece o rompimento da emulsão e a formação de duas fases líquidas separadas, que pode ocorrer a partir de diferentes mecanismos, sendo os principais: cremação gravitacional, floculação e coalescência das gotas (DICKINSON,

1992). Na floculação, as gotas emulsificadas se associam em flocos sem a destruição das gotas individuais. Quando as paredes das gotas são destruídas e existe a formação de gotas maiores trata-se do processo conhecido como coalescência. Já a cremeação ocorre quando a fase dispersa é menos densa do que a fase contínua, porém não existe coalescência (HILL, 1996).

Para promover estabilização das emulsões, são adicionados dois tipos de ingredientes: estabilizantes e emulsificantes (DICKINSON, 1992). Os estabilizantes são componentes que conferem estabilidade às emulsões por longo período de tempo (DICKINSON, 1992), sendo representados pelos polissacarídeos e proteínas, compostos de alta massa molar, como por exemplo, a xantana e o caseinato de sódio. A principal ação dos estabilizantes é via modificação da viscosidade ou gelificação da fase contínua aquosa (DICKINSON, 2003). Já os emulsificantes são moléculas anfifílicas que promovem a formação da emulsão e estabilização por ação interfacial. Existem duas grandes classes de emulsificantes usadas no processamento de alimentos: surfactantes de baixa massa molar e emulsificantes macromoleculares (DICKINSON, 2003). Entretanto, o uso de alguns surfactantes sintéticos está sendo banido por alguns mercados consumidores, buscando-se o uso de ingredientes naturais como estabilizantes, por exemplo as proteínas.

As proteínas são adsorvidas nas gotas de óleo que se formam no processo de homogeneização, atuando de duas maneiras: (1) reduzindo a tensão interfacial, e (2) formando membranas protetoras ao redor das gotas. Estas membranas cobertas por proteínas levam à repulsão entre as gotas devido a uma combinação de interações eletrostáticas e estéricas, além de aumentar a resistência à ruptura devido a sua alta viscoelasticidade (MCCLEMENTS, 2005). O fato das proteínas poderem apresentar algumas dessas propriedades depende do balanço adequado entre seu tamanho, carga,

hidrofobicidade da superfície e flexibilidade molecular (TURGEON et al., 1992). Proteínas do leite e do ovo, como o caseinato de sódio, o isolado protéico de soro e a ovoalbumina, são emulsificantes naturais comumente utilizados na indústria de alimentos, sendo que as propriedades emulsificantes/estabilizantes do colágeno não hidrolisado ainda foram pouco discutidas e exploradas.

2.2. Métodos de emulsificação

As emulsões O/A são formadas a partir da aplicação de energia mecânica em uma mistura de óleo e água, utilizando-se misturadores do tipo rotor-estator, homogeneizadores a altas pressões, emulsificadores ultrasônicos e sistemas de membranas. Os processos influenciam diretamente a adsorção da proteína na interface, diâmetro de gota e estabilidade dos sistemas, produzindo emulsões com diferentes propriedades físico-químicas e organolépticas (PERRIER-CORNET et al., 2005).

2.2.1. Homogeneização a alta pressão

A homogeneização a alta pressão é uma tecnologia emergente que visa à redução do tamanho de gotas da macro-emulsão pré-formada por misturadores do tipo roto-estator, por exemplo (MCCLEMENTS, 2005). Dependendo do diâmetro das gotas formadas, as emulsões podem ser divididas em mini/nanoemulsões (20-500 nm) e macro-emulsões (0,5 – 100µm) (WULFF-PÉREZ, et al., 2009).

Durante a homogeneização a alta pressão, a macro-emulsão passa por um estreito orifício sob uma pressão elevada. O fluido acelera rapidamente, alcançando uma velocidade de 300m/s nos micro canais. A energia fornecida pelo processo como resultado do cisalhamento, impacto e cavitação é representada como a energia livre adicional necessária

para a criação de uma grande área interfacial, resultando numa redução do tamanho de gotas (ANTON et al., 2008). Durante o processo ocorre um equilíbrio dinâmico entre a quebra das gotas, colisões e posterior recoalescência. O mecanismo de turbulência é responsável por este fenômeno, apesar do escoamento laminar e de cavitação desempenhar um papel importante na formação das novas gotas. Além do tamanho da gota, a distribuição do tamanho também afeta diretamente a textura e estabilidade das emulsões e esta pode ser controlada pela taxa de quebra e coalescência das gotas, ou seja, adequando as condições do processo de homogeneização (FLOURY et al., 2000). Segundo Walstra (1997), o diâmetro médio das gotas (d_{32}) é proporcional à pressão de homogeneização (P_h), sendo $d_{32} \propto P_h^{0,6}$, para emulsões homogeneizadas em pressões de 7 a 40 MPa e com baixo conteúdo de fase dispersa.

Além da redução do tamanho de gotas e partículas, algumas reações ou alterações físicas são favorecidas em altas pressões, como a desnaturação de proteínas. No seu estado nativo, as proteínas são estabilizadas por ligações covalentes, interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Ligações covalentes praticamente não são afetadas por alta pressão e, portanto, a estrutura primária de proteínas segue intacta durante a homogeneização (MOZHAEV et al., 1996). Mudanças na estrutura secundária ocorrem em altas pressões e levam à desnaturação irreversível, uma vez que as ligações de hidrogênio que a estabilizam são reforçadas em baixas pressões e rompidas em níveis muito altos de pressão (HUPPERTZ et al., 2002 e 2004).

2.3. Colágeno

O termo colágeno deriva das palavras gregas KOLLA (cola) e GENNO (produção), e de fato, esta proteína foi amplamente empregada como matéria-prima na produção de cola

animal. Atualmente, o colágeno tem sido utilizado como biomaterial nas áreas médica e farmacêutica devido a sua baixa antigenicidade, biocompatibilidade, além de ser facilmente absorvido pelo corpo humano (FRIESS, 1998). Já na indústria de cosméticos, o colágeno tem sido usado como umectante na produção de cremes, tendo grande apelo comercial já que o colágeno presente nas camadas inferiores da pele é responsável pela sua firmeza e elasticidade (BAILEY & LIGHT, 1989). Na indústria de alimentos, o colágeno é tradicionalmente utilizado na forma de gelatina, polipeptídeo solúvel e completamente desnaturado obtido a partir do aquecimento controlado do colágeno em meio alcalino ou ácido. No entanto, o colágeno com baixo teor de hidrólise tem sido pouco aplicado como um ingrediente funcional na indústria de alimentos, provavelmente devido a sua baixa solubilidade (MONTERO & BORDERIAS, 1991), apesar de sua elevada capacidade de retenção de água e formação de géis (NEKLYUDOV, 2002).

O colágeno é uma proteína fibrosa composta por três cadeias que associadas formam uma tripla hélice. Está presente no músculo, pele, tendão, cartilagem, ossos, córnea e sistema vascular, representando cerca de 30 % das proteínas presentes nos vertebrados. Existem pelo menos 13 tipos de colágenos que variam na extensão de sua hélice e na natureza e tamanho das porções não helicoidais, sendo o colágeno tipo I o mais abundante na natureza, o qual é encontrado em regiões que suportam forças extremas, como ossos, tendões e peles (FRIESS, 1998).

2.3.1. Estrutura e composição

O colágeno possui uma seqüência específica de aminoácidos constituída de subunidades de repetição Glicina-X-Y (Figura 2.1a). Aproximadamente 35% das posições não ocupadas pela glicina possuem os aminoácidos prolina e hidroxiprolina nas posições X

e Y, respectivamente. Colágeno tipo I é constituído por três cadeias, sendo duas levógiras (α_1) que se enrolam em uma dextrógira (α_2) formando a estrutura de α -hélice mantida principalmente por ligações de hidrogênio (Figura 2.1b). As extremidades das cadeias polipeptídicas são globulares, onde se localizam ligações de sulfeto intermoleculares estabilizando a estrutura das fibrilas colagenosas. Ligações covalentes entre grupos aldeídos e aminoácidos livres também são encontradas entre as cadeias α (NEKLYUDOV, 2002). O monômero de tropocolágeno possui massa média molar de 300kDa e 300nm de comprimento com 1,5 nm de diâmetro, dimensões que propiciam elevada viscosidade às soluções e alta mobilidade dos componentes iônicos. As moléculas de tropocolágeno se rearranjam longitudinal e bilateralmente formando uma estrutura quaternária (Figura 2.1c), que se agregam originando as miofibrilas e posteriormente as fibras (FRIESS, 1998).

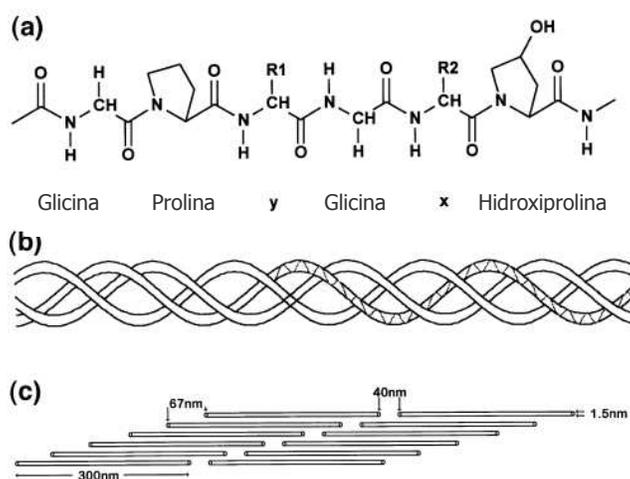


Figura 2.1. Estrutura química do colágeno tipo I. (a) Sequência primária de aminoácidos, (b) estrutura secundária e terciária e (c) estrutura quaternária (Fonte: Friess, 1998).

A composição de aminoácidos da molécula de colágeno representada na Tabela 2.1 é constituída por aproximadamente 60% de resíduos hidrofóbicos e 40% de resíduos

hidrofílicos que conferem à proteína um caráter anfifílico e uma capacidade emulsificante (BAILEY & LIGHT, 1989). Os aminoácidos não-essenciais (glicina, prolina, hidroxiprolina, arginina e alanina) constituem 2/3 dos resíduos e os aminoácidos essenciais (metionina, tirosina e histidina) estão presentes em pequena quantidade. Cisteína e triptofano estão comumente ausentes, enquanto que a hidroxiprolina (11%) está presente em elevada quantidade, sendo utilizada para indicar o teor de colágeno de um material porque este aminoácido não está comumente presente em proteínas não colagenosas (ASGHAR & HENRICKSON, 1982).

Tabela 2.1. Composição de aminoácidos (g/100g de proteína) da fibra de colágeno (Fonte: Wolf et al., 2009).

Aminoácidos	% (g/g)
Cisteína	0,2 ± 0,0
Ácido aspártico	5,6 ± 0,5
Ácido Glutâmico	11,9 ± 0,1
Arginina	8,7 ± 0,5
Lisina	3,6 ± 0,2
Histidina	0,7 ± 0,1
Treonina	1,9 ± 0,1
Serina	3,0 ± 0,1
Prolina e Hidroxiprolina	13,0 ± 0,3
Alanina	9,3 ± 0,1
Glicina	29,7 ± 0,5
Leucina	3,1 ± 0,0
Valina	2,5 ± 0,0
Metionina	0,6 ± 0,0
Isoleucina	1,6 ± 0,0
Fenilalanina	2,3 ± 0,0
Tirosina	0,5 ± 0,0

O baixo teor de aminoácidos essenciais compromete o valor nutricional do colágeno. Entretanto, combinações de colágeno na alimentação humana ou animal para suplementar a dieta com alguns aminoácidos pode ser viável. A substituição da carne gorda ou magra em embutidos suínos ou bovinos até o nível de 20% de colágeno não prejudica as

propriedades funcionais do produto final e os requerimentos nutricionais da dieta (RAO & HENRICKSON, 1983). Além disto, a fibra de colágeno é capaz de facilitar a digestão, regular a absorção de nutrientes no intestino humano e eliminar substâncias tóxicas (NEKLYUDOV, 2003).

2.3.2. Propriedades emulsificantes do colágeno

A estabilidade de uma emulsão é influenciada pelo seu pH, pois a repulsão estérica entre as gotas é transformada em atração à medida que o pH se aproxima do pI da proteína emulsificante, favorecendo a separação de fases (DICKINSON, 2006). Foi observado que a capacidade emulsificante de material colagenoso extraído de peixes foi maior em níveis de pH entre 1 e 3 e decresceu à medida que o pH aumentou (MONTERO & BODERÍAS, 1991) e se aproximou do ponto isoelétrico (pI) desta proteína, entre 6,5 e 8,5 (NEKLYUDOV, 2003). O pI relativamente elevado do colágeno pode viabilizar a estabilidade de emulsões em uma faixa de pH ácida, que é o caso da maior parte das emulsões alimentícias. Além disso, o uso do colágeno em valores de pH abaixo do pI também poderia favorecer a proteção de lipídios poliinsaturados presentes em emulsões alimentícias. Em pH abaixo do pI, as proteínas formam uma membrana interfacial carregada positivamente ao redor das gotas de óleo, repelindo eletrostaticamente íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , catalisadores da oxidação de lipídeos presentes na fase aquosa (HU et al., 2003).

As propriedades funcionais do colágeno estão intimamente relacionadas com a distribuição da massa molar de suas fibras, que varia de acordo com as características da matéria-prima e condições do processo de obtenção do material (OLIJVE et al., 2001). Ral'f (1994), citado por Neklyudov (2003), observou uma maior absorção de água e atividade emulsificante quando existe um excesso de frações de colágeno com massa molar

entre 120 e 170kDa. Segundo Olijve et al. (2001), moléculas de elevada massa molar são capazes de estabilizar estericamente a emulsão, enquanto frações de menor massa expõem os resíduos hidrofóbicos e propiciam a estabilidade eletrostática (OLIJVE et al., 2001).

A hidrólise, seja térmica (MONTERO et al., 1995) ou enzimática (SATTERLEE & ZACHARIAH, 1973), determina a massa molar do colágeno e conseqüentemente sua solubilidade e propriedades emulsificantes. Segundo Montero et al. (1995), a desnaturação térmica de colágeno extraído de peixes inicia-se antes de 30°C e é substancial em 40°C, intervalo semelhante ao encontrado por Borderías e Pudzki (1985) em análise de calorimetria diferencial de varredura. Já em colágeno de mamíferos, a temperatura de desnaturação está em torno de 65°C. Esta variação ocorre naturalmente entre as espécies de acordo com a composição de hidroxiprolina (BAILEY & LIGHT, 1989). Nesta temperatura, o colágeno passa por transformações, ocorrendo um desalinhamento das fibras de colágeno, o colapso da tripla hélice em subunidades polipeptídicas e o rompimento de muitas ligações não covalentes, algumas ligações covalentes inter e intramoleculares (ligações cruzadas) e poucas ligações peptídicas, resultando na conversão da estrutura helicoidal do colágeno a uma forma mais amorfa (ALVES & FERREIRA, 2002), onde o trímero (α_1 , α_2 , β) é desintegrado em dímeros ou cadeias individuais (LIU et al., 2008), e até em frações de menor massa molar, mais solúvel e com maior capacidade de retenção de água (ALVES & FERREIRA, 2002).

Material colagenoso extraído de pés de frango e submetido à secagem a 35° C apresentou maior capacidade emulsificante do que o material liofilizado. No processo a temperaturas mais elevadas, o colágeno provavelmente apresentou uma maior quantidade de moléculas desdobradas, ou seja, com regiões hidrofóbicas expostas que proporcionou

melhor capacidade emulsificante. Já o colágeno liofilizado foi mais solúvel e permitiu uma maior interação proteína-proteína, resultando na formação de um filme interfacial mais coeso e viscoelástico que ofereceu mais estabilidade à emulsão (ALVES & FERREIRA, 2002; MONTERO & BORDERÌAS, 1991).

Em comparação com outras proteínas funcionais usualmente utilizadas na indústria de alimentos, o colágeno possui maior capacidade de retenção de água que o plasma e o caseinato, sendo uma solução viável para a produção de alimentos com baixo teor de gordura, como derivados de carne bovina. Já a capacidade emulsificante do colágeno é inferior à proteína de soja, caseinato e plasma, provavelmente devido à insolubilidade do isolado protéico de colágeno. Entretanto, o colágeno possui uma preponderante função estabilizante e texturizante em embutidos de carne quando seu teor não supera 15% de sua massa em relação à proteína total, sugerindo que o colágeno possui propriedades emulsificantes tão boas quanto de outras proteínas da carne, como a actimiosina (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2002).

2.4. Propriedades reológicas

A reologia estuda a forma como os materiais respondem a uma tensão ou deformação aplicada, sendo utilizada na indústria de alimentos em projetos de tubulações e equipamentos, determinação da funcionalidade de ingredientes, desenvolvimento de produtos, controle de qualidade, estudos de vida de prateleira e determinação da textura do alimento (STEFFE, 1996). Particularmente em emulsões, as propriedades reológicas são capazes de avaliar a eficiência de ruptura das gotas em um homogeneizador e a vida de prateleira de emulsões alimentícias, características dependentes da viscosidade das fases individuais. Além disso, as medidas reológicas são frequentemente utilizadas como uma

ferramenta analítica para fornecer informações fundamentais sobre a organização estrutural e interações entre os componentes em emulsões (MCCLEMENTS, 2005).

As características de escoamento de emulsões podem ser influenciadas pelos seguintes fatores: viscosidade e composição química da fase contínua da emulsão, fração volumétrica da fase dispersa; distribuição do tamanho de gotas, deformabilidade e viscosidade das gotas dispersas, reologia do filme interfacial (concentração e estrutura dos tensoativos) e a adição de modificadores reológicos como espessantes (BARNES, 1994; TADROS, 1994, 2004; MCCLEMENTS, 2005).

2.4.1. Curvas de escoamento

Emulsões alimentícias apresentam diferentes comportamentos reológicos que variam desde fluidos de baixa viscosidade (ex: leite) a géis viscoelásticos (ex: iogurtes), até sólidos bastante duros (ex: manteiga refrigerada). No entanto, o comportamento de escoamento das emulsões fluidas pode ser descrito por modelos reológicos simples ou pela combinação de um ou mais modelos simples (MCCLEMENTS, 2005), alguns são mostrados na Figura 2.2.

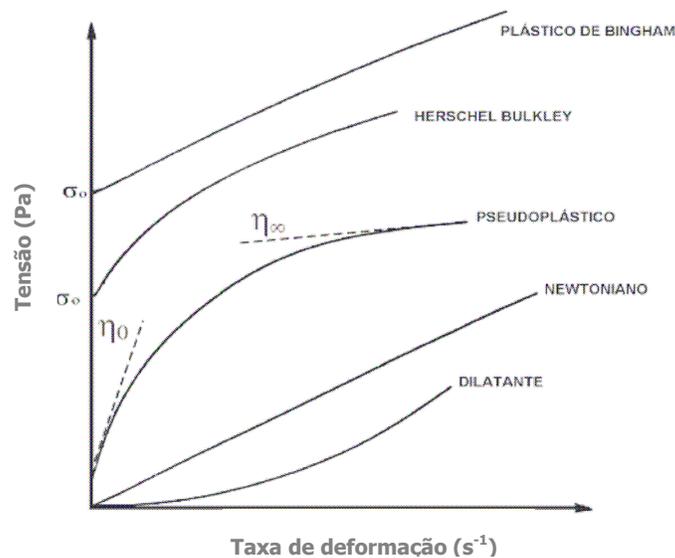


Figura 2.2. Curvas de escoamento para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos independentes do tempo.

Os fluidos Newtonianos apresentam a propriedade de escoar quando uma tensão de cisalhamento é aplicada, sendo a viscosidade (η) uma medida da resistência ao escoamento destes materiais (MACOSKO, 1994) e a constante de proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento (σ) e a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$), como apresentado na Equação 2.

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (2)$$

Já nos fluidos não-Newtonianos, a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação não são diretamente proporcionais (MCCLEMENTS, 2005), sendo que a viscosidade dos sistemas depende da taxa de deformação e também pode ser influenciada pelo tempo de aplicação da tensão (MACOSKO, 1994). Dentre os líquidos não newtonianos dependentes da taxa de deformação estão os fluidos pseudoplásticos e dilatantes, ou seja, fluidos que decrescem ou aumentam, respectivamente, sua viscosidade com o aumento da velocidade de processo (MCCLEMENTS, 2005). Em ambos, torna-se importante o conhecimento da viscosidade aparente, viscosidade específica para cada taxa de deformação (WALSTRA,

2003), já que este é o parâmetro real para cálculos de processos na indústria de alimentos (MCCLEMENTS, 2005). A Tabela 2.2 exemplifica a taxa de deformação de agitação, bombeamento, além da cremeação de uma gota individual da emulsão, ou mastigação de um alimento.

Tabela 2.2. Taxas de deformação típicas observadas em alguns processos relevantes em alimentos.

Processo	Taxa de deformação (s⁻¹)
Agitação	10 ¹ a 10 ³
Bombeamento	10 ⁰ a 10 ³
Cremeação	10 ⁻⁶ a 10 ⁻³
Mastigação	10 ¹ a 10 ²

Fonte: Adaptado de Vanapalli e Coupland (2004).

Alguns fluidos com comportamento não-Newtoniano independente do tempo, como a maionese, margarina e manteiga, apresentam uma tensão residual, de modo que apenas escoam quando essa tensão é excedida. Este tipo de material geralmente apresenta uma rede de moléculas agregadas ou partículas dispersas em uma matriz líquida (WALSTRA, 2003). Eles são classificados como plásticos de Bingham ou Herschel-Bulkley, que apresentam um comportamento linear ou não-linear, respectivamente, para tensões acima da tensão residual.

Os fluidos não-Newtonianos em que a viscosidade é dependente do tempo de aplicação da tensão possuem comportamento relevante para as indústrias de alimentos, que devem controlar cuidadosamente a potência necessária em processos como bombeamento ou agitação, especialmente os de curta duração. Eles podem ser classificados como tixotrópicos e reopéticos, onde a viscosidade aparente do fluido diminui ou aumenta,

respectivamente, com o tempo de cisalhamento sob uma taxa de deformação constante (MCCLEMENTS, 2005).

2.4.2. Reologia oscilatória

Alguns materiais apresentam comportamento viscoelástico, ou seja, não são nem líquidos puros e nem sólidos puros, apresentando propriedades reológicas que são parcialmente elásticas e parcialmente viscosas (WALSTRA, 2003). Quando se aplica uma energia mecânica em materiais viscoelásticos, parte da energia é estocada no material na forma de energia elástica, enquanto que parte é dissipada na forma de calor na forma de energia viscosa (MCCLEMENTS, 2005).

A análise de um material viscoelástico é bastante simples quando a razão entre a tensão e a deformação, em qualquer instante ou frequência, é independente da magnitude de tensão ou deformação aplicada, sendo apenas função do tempo. Nestas condições, o material encontra-se dentro do intervalo de viscoelasticidade linear, pois se trabalha com deformações muito pequenas e a estrutura molecular praticamente não é afetada (BARNES et al., 1989). Na caracterização da viscoelasticidade linear existem vários tipos de experimentos que determinam as relações entre tensão, deformação e tempo. Dentre eles, o mais utilizado é o ensaio oscilatório, em que uma tensão ou deformação senoidal é aplicada, obtendo-se como resposta a deformação ou tensão oscilatória. Os ensaios oscilatórios em cisalhamento são particularmente úteis para caracterizar a conformação macromolecular e interações intermoleculares em solução.

CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Colágeno extraído de couro bovino, na forma de pó e de fibra, foi doado pela NovaProm Food Ingredients (Lins, Brasil). Eles se diferenciam pelo tamanho de partícula, sendo o mais fino classificado como pó e o de maior granulometria como fibra. O óleo de soja (Soya, Bunge Alimentos S.A., Brasil) foi obtido em um supermercado local. Demais reagentes de grau analítico foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St Louis - USA).

3.2. Métodos

Uma descrição de toda a metodologia desenvolvida neste trabalho encontra-se esquematizada nas Figuras 3.1 e 3.2 e Tabelas 3.1 e 3.2, sendo detalhada nos itens posteriores.

Com o intuito de modificar as propriedades emulsificantes/estabilizantes do colágeno, foi realizada uma hidrólise parcial da fibra de colágeno. A Figura 3.1 apresenta o processo de hidrólise térmica, incluindo a seqüência de análises realizadas para a caracterização físico-química dos hidrolisados.

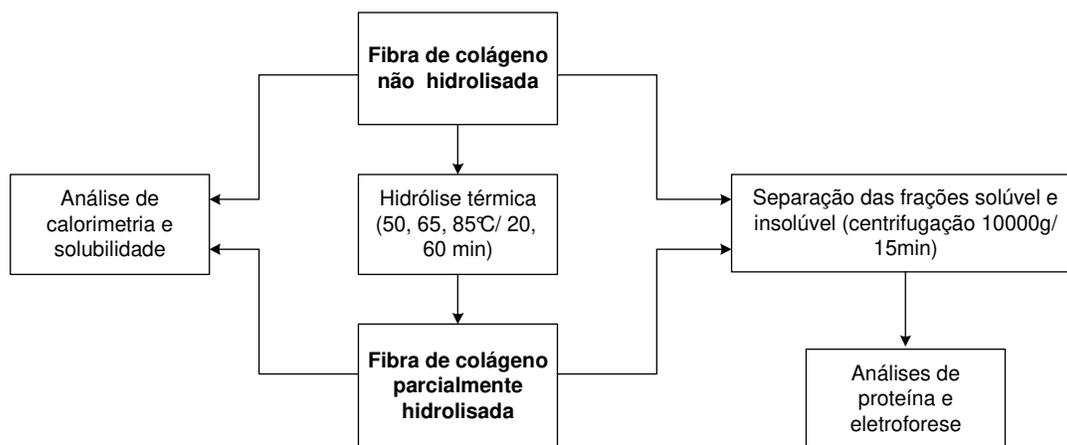


Figura 3.1. Representação esquemática do processo de hidrólise térmica da fibra de colágeno e avaliação do material obtido.

Após a obtenção dos diferentes emulsificantes, que incluem o pó de colágeno, a fibra de colágeno não hidrolisada e os hidrolisados, as macro-emulsões foram preparadas por pré-homogeneização e as micro-emulsões foram em seguida produzidas com o uso de homogeneizadores a altas pressões. A descrição detalhada se encontra na Figura 3.2.

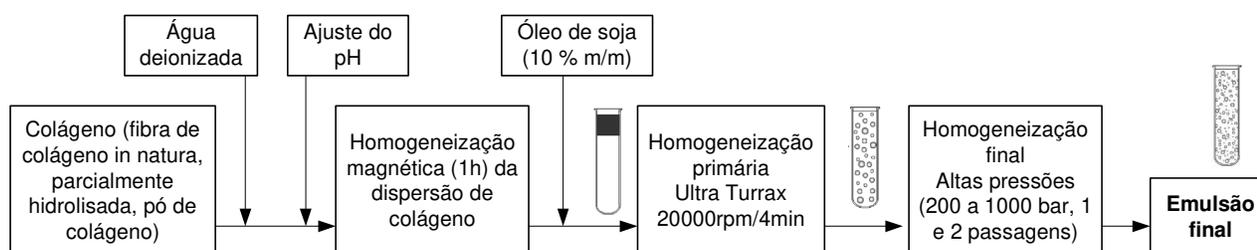


Figura 3.2. Representação esquemática dos processos de homogeneização para obtenção das emulsões.

As Tabelas 3.1 e 3.2 descrevem as emulsões produzidas, as variáveis analisadas, as matérias-primas utilizadas como emulsificante/estabilizante, o processo de homogeneização, bem como as análises realizadas para a sua caracterização.

Tabela 3.1. Análises realizadas nas emulsões estabilizadas por colágeno não hidrolisado.

Parte 1: Emulsões estabilizadas por colágeno na forma de fibra não hidrolisada e de pó.		
Tipo de emulsão	Variáveis analisadas	Análises realizadas
Macro-emulsão	<ul style="list-style-type: none"> • pH. • Conteúdo de proteína. • Tipo de emulsificante (fibra de colágeno não hidrolisada e pó de colágeno). 	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade à separação de fases. • Microscopia / tamanho de gota.
Micro-emulsão	<ul style="list-style-type: none"> • Pressão de homogeneização (200, 400, 600, 800, 1000 bar). • Número de passagens pelo homogeneizador (1, 2). 	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade à separação de fases. • Microscopia / tamanho de gota. • Reologia (estacionário e oscilatório).

Tabela 3.2. Representação esquemática das análises realizadas nas emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado.

Parte 2: Emulsões estabilizadas por fibra de colágeno parcialmente hidrolisada.		
Tipo de emulsão	Variáveis analisadas	Análises realizadas
Macro-emulsão	<ul style="list-style-type: none"> • pH. • Fibra de colágeno hidrolisada em diferentes tratamentos térmicos (50, 65, 85°C / 20, 60 min). • Conteúdo de proteína solúvel 	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade à separação de fases. • Composição química das fases separadas. • Microscopia / tamanho de gota.
Micro-emulsão	<ul style="list-style-type: none"> • Fibra de colágeno hidrolisada em diferentes tratamentos térmicos (50, 65, 85°C / 20, 60 min). • Pressão de homogeneização (200, 600, 1000 bar). 	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade à separação de fases. • Microscopia / tamanho de gota. • Reologia (estacionário e oscilatório).

3.2.1. Preparo da fibra de colágeno parcialmente hidrolisada

Dispersões de fibras de colágeno não hidrolisada (4 % m/m) foram inicialmente preparadas pela sua dissolução em água deionizada, sem ajuste de pH (próximo a 9,2), e mantidas sob agitação magnética por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, estas dispersões foram submetidas a tratamentos térmicos (50°C/20min, 50°C/60min, 65°C/20min, 65°C/60min, 85°C/20min e 85°C/60min) em um tanque encamisado com circulação de água quente, sendo mantida a agitação magnética e a temperatura da dispersão certificada constantemente com o auxílio de um termômetro. Ao final, as dispersões foram resfriadas em banho de gelo para interromper o processo de hidrólise térmica.

3.2.2. Análises do colágeno parcialmente hidrolisado

3.2.2.1. Determinação do ponto isoelétrico

Dispersões de fibra de colágeno não hidrolisada e previamente hidrolisada de acordo com o item 3.2.1 tiveram seus valores de pH ajustados na faixa entre 2,5 e 10,5 com adição de HCl 1N e NaOH 1N, sendo em seguida mantidas sob agitação magnética durante 1 hora. As dispersões foram então centrifugadas a 10000 g/15min, a 25 °C em uma ultracentrífuga L8-80M Beckman (USA), sendo que o sobrenadante foi posteriormente filtrado em papel Whatman nº. 1.

A solubilidade protéica (% S) foi determinada de acordo com a Equação 3 (MORR et al, 1985), sendo A e B o conteúdo de proteína do sobrenadante e da fibra de colágeno não hidrolisada, respectivamente, determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1992). O ponto isoelétrico foi identificado no ponto de mínimo da curva de solubilidade em função do pH, ponto em que a proteína é menos solúvel.

$$\%S = \frac{A.W_t}{B.W_p} 100 \quad (3)$$

onde W_t é a massa do filtrado e W_p é a massa da fibra de colágeno.

3.2.2.2. Calorimetria diferencial de varredura

As propriedades térmicas do colágeno foram obtidas por calorimetria diferencial de varredura, utilizando um equipamento TA Instruments, modelo DSC-2920 (New Castle, USA) com uma unidade de resfriamento mecânico acoplada (Refrigerated Cooling Systems). Cápsulas herméticas de alumínio contendo aproximadamente 10 mg de dispersão de pó e fibra de colágeno foram colocadas no equipamento e aquecidas na razão de

10°C.min⁻¹ em um intervalo entre 20 e 120°C. A partir da diferença de fluxo de calor entre a cápsula com amostra e a referência (sem amostra), obteve-se um termograma, no qual foi possível identificar a temperatura de desnaturação (T_{desn}), representada pelo ponto de máximo fluxo de calor. Também foi avaliada a temperatura inicial de desnaturação (T_{onset}), calculada a partir da interseção entre a linha base e a extrapolação do ponto máximo de fluxo de calor, bem como a quantidade de energia (ΔH) requerida na desnaturação das matrizes, calculada pela área compreendida entre a linha base e a curva do fluxo de calor durante a desnaturação da proteína. As análises foram realizadas em triplicata em dispersões de fibras de colágeno não hidrolisada e do colágeno parcialmente hidrolisado contendo 10% (m/m) de proteína.

3.2.2.3. Solubilidade da fibra de colágeno

Para a análise das frações de proteína solúvel e insolúvel, as dispersões de fibras de colágeno não hidrolisada e parcialmente hidrolisada foram colocadas em tubos de centrífuga e centrifugadas a 10000g/15min, 25°C, em uma ultracentrífuga L8-80M Beckman (USA), para a separação do sobrenadante e precipitado. As fases foram cuidadosamente retiradas, pesadas e estocadas para posteriores análises do teor de proteína, determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1992), e eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.2.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida permite a determinação das massas molares dos constituintes das fibras de colágeno não hidrolisada do colágeno parcialmente hidrolisado e de suas frações solúvel e insolúvel. Para a construção do gel foram utilizadas

lâminas verticais de vidro (Bio-Rad, Hercules-CA), em que a poliacrilamida ainda não polimerizada foi adicionada. Os ensaios foram realizados em gel de poliacrilamida com concentrações variando de 8 a 10% para o gel de resolução e de 5% para o gel de empacotamento. As soluções de proteína foram diluídas em água deionizada e 30 µg de amostra foi aplicada nos compartimentos formados no topo do gel de empacotamento de poliacrilamida. A amostra foi diluída na razão de 1:2 em um tampão de amostra pH 6,8 (50 mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 10% de glicerol (v/v) e 0,1% (m/v) de Comassie Brilliant Blue). O tampão de corrida (pH 8,3) continha 25 mM de Tris-HCl e 250mM de glicina. O gel de resolução e o gel de empacotamento foram compostos por tampão com 0,1% de SDS e Tris-HCl, em pH 8,8 e 6,8, respectivamente. Após as corridas, todos os géis foram corados com 0,25% (p/v) Comassie Brilliant Blue em metanol/ácido acético glacial/água (4,5:1:4,5) e para o contraste estes foram descorados em solução de 1% (m/v) de metanol e 2,5% (m/v) de ácido acético. Foi utilizado como padrão um marcador comercial de massa molar entre 19 – 180 kDa (prestained Invitrogen™ Bench Marker protein leader, Byoagency International, Jacksonville, USA).

3.2.3. Preparo das Emulsões

3.2.3.1. Preparo das dispersões de colágeno

O pó de colágeno, a fibra de colágeno não hidrolisada e a fibra de colágeno parcialmente hidrolisada foram utilizados no preparo das emulsões. O colágeno foi diluído em água deionizada para a concentração desejada, 0,5 a 4,0% (m/m) de proteína, sendo mantido sob constante agitação por 1 hora em temperatura ambiente. O pH das dispersões

foi constantemente ajustado com HCl 1 N ou NaOH 1N para valores entre de 3,5 e 7,5. Azida sódica (0,01%, m/v) foi adicionada à água deionizada como agente antimicrobiano.

3.2.3.2. Processo de homogeneização

Após o preparo das dispersões de colágeno, o óleo de soja (10 % m/m) foi adicionado e então misturado com o auxílio de um ULTRA-TURRAX IKA modelo T18 basic (Alemanha) a 20000 rpm por 4 minutos para a formação das macro-emulsões. Com o intuito de produzir micro-emulsões (tamanho de gotas reduzido), as macro-emulsões foram homogeneizadas a altas pressões em um homogeneizador de dois estágios NS1001L2K-PANDA2K, Niro Soave S.p.A. (Parma, Itália). A pressão no primeiro estágio variou entre 200 a 1000 bar e no segundo estágio foi de 50 bar. Foi avaliado também o número de passagens (1 ou 2) da emulsão pelo homogeneizador. Para realizar o processo de segunda passagem, uma parte da amostra obtida após a primeira passagem pelo homogeneizador foi coletada e novamente submetida ao processo de homogeneização no mesmo nível de pressão.

Os seguintes sistemas foram avaliados:

- Macro-emulsões estabilizadas por pó de colágeno e fibra de colágeno não hidrolisada, em concentração de proteína variando de 0,5 a 4,0 % (m/m) e pH entre 3,5 e 7,5;
- Micro-emulsões estabilizadas com fibra não hidrolisada, contendo 0,5 % de proteína, em pH 3,5;
- Macro-emulsões estabilizadas por 1,0 % de proteína de fibra de colágeno previamente submetida aos tratamentos térmicos, em pH ajustado a 3,5 e pH não ajustado (próximo de 9,2);

- Macro-emulsões estabilizadas pelas frações solúvel e insolúvel da fibra de colágeno parcialmente hidrolisada, em diferentes proporções, totalizando 1% de proteína, em pH não ajustado (próximo a 9,2);
- Micro-emulsões estabilizadas por fibra parcialmente hidrolisada, contendo 0,5 % de proteína, em pH 3,5.

3.2.4. Análises das emulsões

3.2.4.1. Estabilidade

Imediatamente após o processo de homogeneização, alíquotas de emulsão foram transferidas para tubos graduados e armazenadas por 7 dias à temperatura ambiente, sendo o volume da fase inferior quantificado diariamente. O índice de cremação foi reportado como $ACT\% = 100x (\text{altura da interface da fase separada})/(\text{altura total de emulsão})$.

As macro-emulsões foram avaliadas em provetas de 10 mL, com 15,5 mm de diâmetro interno e 65 mm altura, enquanto que as micro-emulsões foram avaliadas em provetas de 50 mL, com 25 mm de diâmetro interno e 95 mm de altura. Para facilitar visualização da separação de fases das emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado, corante Sudan III, de coloração avermelhada, foi adicionado ao óleo de soja. Foram realizadas 3 repetições em 3 determinações independentes.

3.2.4.2. Caracterização química das fases

Após a separação de fases e alcance do equilíbrio cinético, ou seja, quando os volumes das fases oleosa (creme) e aquosa se mantiveram constantes, realizou-se a caracterização química das fases separadas das macro-emulsões estabilizadas por colágeno

parcialmente hidrolisado. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1992) com um fator de correção de 5,5, a umidade foi determinada por diferença de massa após secagem em estufa na temperatura de 70°C (AOAC 1992) e a concentração de óleo foi determinada pelo método de Bligh & Dyer (BLIGH & DYER, 1959).

3.2.4.3. Caracterização microscópica e tamanho de gotas

As análises microscópicas das emulsões foram realizadas em microscópio óptico Carl Zeiss modelo MF-AKS 24 x 36 EXPOMET (Zeiss, Alemanha), em que uma alíquota de emulsão foi colocada em lâmina, coberta com lamínula e visualizada com um aumento de 400 e 1000 x. Foram obtidas cerca de 10 fotografias ao longo de toda a lâmina para posterior análise de imagem. Nas macro-emulsões, as análises foram realizadas após setes dias de estocagem, enquanto que nas micro-emulsões, elas foram realizadas no momento correspondente às análises reológicas, no primeiro ou segundo dia. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente.

As imagens das macro-emulsões foram analisadas segundo metodologia descrita por Perrechil (2008) e Pugnaroni et al. (2005). Com o auxílio do software Image J 1.36b ([HTTP://rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/)), as fotografias foram primeiramente convertidas para imagens em escala de cinza 8-bit de 640-480 pixels, apresentando níveis de cinza entre 0 e 255. Cada uma das imagens foi então binarizada, utilizando-se a mediana do histograma do nível de cinza como parâmetro de binarização. Após isso, a escala das imagens foi determinada através de uma conversão de pixels para micrômetros e, então, foram obtidas as medidas de diâmetro das gotas das emulsões (PERRECHIL, 2008). Já as micro-emulsões apresentaram partículas de tamanho muito reduzido, menores que 5 µm, sendo analisadas segundo

metodologia descrita por Rocha (2009), com algumas modificações, ou seja, medindo-se cerca de 500 gotas presentes em 3 lâminas representativas de cada sistema, também com o auxílio do software Imaje J 1.36b.

O tamanho das gotas foi caracterizado em termos do diâmetro médio superficial d_{32} , calculado a partir da Equação 4. O diâmetro médio superficial e volumétrico correspondem ao diâmetro da esfera que possui a mesma área superficial e mesmo volume, respectivamente, das gotas das emulsões.

$$d_{xy} = \frac{\sum n_i d_i^x}{\sum n_i d_i^y} \quad (4)$$

onde n_i é o número de partículas com diâmetro d_i .

3.2.4.4. Medidas Reológicas

As análises reológicas foram realizadas nas micro-emulsões, utilizando um reômetro modular compacto Physica MCR301 da Anton Paar (Alemanha). Todas as medidas foram feitas em triplicata, em geometria de placas paralelas com temperatura controlada em 25°C por sistema Peltier e gap de 0,6 mm. As análises reológicas das micro-emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado foram realizadas após 1 dia de estocagem, com o intuito de garantir que as emulsões tivessem atingido o equilíbrio cinético, utilizando geometria de placas paralelas de aço inoxidável de 75 mm de diâmetro. As medidas reológicas das emulsões estabilizadas por colágeno não hidrolisado foram realizadas imediatamente após a homogeneização das emulsões (antes da separação de fases), utilizando geometria de placas paralelas de vidro de 50 mm de diâmetro nos ensaios de escoamento estacionário e de placas paralelas de aço inoxidável de 75 mm de diâmetro nos ensaios oscilatório.

As curvas de escoamento foram obtidas através de um programa de passos múltiplos usando intervalos de tensões de cisalhamento diferentes para cada amostra, porém que correspondessem a um intervalo entre 0-300 s⁻¹, aproximadamente. Desta maneira pode-se avaliar a relação entre viscosidade (η) e taxa de deformação. Os modelos do tipo Lei da Potência (Equação 5) e Herschel-Bulkley (Equação 6), foram utilizados para ajustar as curvas de escoamento aos dados:

$$\sigma = k * (\dot{\gamma})^n \quad (5)$$

$$\sigma = \sigma_0 + k * (\dot{\gamma})^n \quad (6)$$

onde σ corresponde ao valor de tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ à taxa de deformação (s⁻¹), σ_0 à tensão residual (Pa), n ao índice de comportamento e k ao índice de consistência (Pa.sⁿ).

Para a realização das análises de reologia oscilatória, um teste de varredura de tensão foi realizado a fim de determinar a região de viscoelasticidade linear. Posteriormente, varreduras de frequência (0,1 – 10,0 Hz) foram feitas usando uma tensão fixa dentro do intervalo de viscoelasticidade linear. Os módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') foram avaliados em função da frequência.

3.2.5. Análises Estatísticas

A avaliação dos dados foi realizada com auxílio de análises estatística, realizando a comparação de médias entre os dados por meio do teste de Tukey, através da Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância, com o programa STATISTICA[®] 5.0.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Parte 1. Emulsões estabilizadas por colágeno na forma de fibra não hidrolisada e de pó

4.1. Macro-emulsões

As macro-emulsões O/A foram preparadas utilizando-se um triturador – misturador tipo “Ultra-Turrax”, sendo que a concentração de óleo de soja foi fixada em 10 % (m/m), variando-se o pH (3,5, 4,5, 5,5, e 7,5), tipo de ingrediente (pó ou fibra de colágeno) e sua concentração (0,5 %, 1,0 %, 2,0 %, 3,0 % e 4,0 % m/m).

4.1.1. Estabilidade

Algumas emulsões apresentaram-se cineticamente instáveis, com a formação de uma fase inferior aquosa e de uma fase superior oleosa. O processo de separação de fases das emulsões foi mais acentuado nas primeiras 24 horas após o preparo das amostras, exceto as emulsões com 0,5% proteína de fibra (m/m) em pH 3,5 e 1,0% de proteína em pH 3,5 e 4,5, que apresentaram uma menor taxa de separação de fases em função de sua maior estabilidade cinética (Figuras 4.1 e 4.2), com separação de fases significativa após 24h de seu preparo e estocagem.

A elevação da concentração de proteína aumentou a estabilidade das emulsões, sendo que as emulsões preparadas com pó de colágeno precisaram de uma maior quantidade de proteína para demonstrarem estabilidade equivalente às emulsões com fibra de colágeno (Tabelas 4.1 e 4.2). A fibra possui frações protéicas de maior massa molar que o pó de colágeno (MÁXIMO E CUNHA, 2008), viabilizando a estabilização das emulsões através do impedindo estérico ou mecânico das gotas.

Tabela 4.1. Índice de cremeação das emulsões estabilizadas por fibra de colágeno mensurado pelo volume da fase inferior em relação ao volume total (% v/v).

% proteína de fibra de colágeno (m/m)	pH			
	3,5	4,5	5,5	7,5
0,5	1,00 ± 0,00	63,00 ± 0,00	56,33 ± 0,06	65,67 ± 0,23
1	0,00 ± 0,00	54,33 ± 0,12	53,67 ± 0,21	57,50 ± 0,21
2	0,00 ± 0,00	15,33 ± 0,42	29,00 ± 0,20	29,00 ± 0,20
3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,67 ± 0,06	13,33 ± 0,58

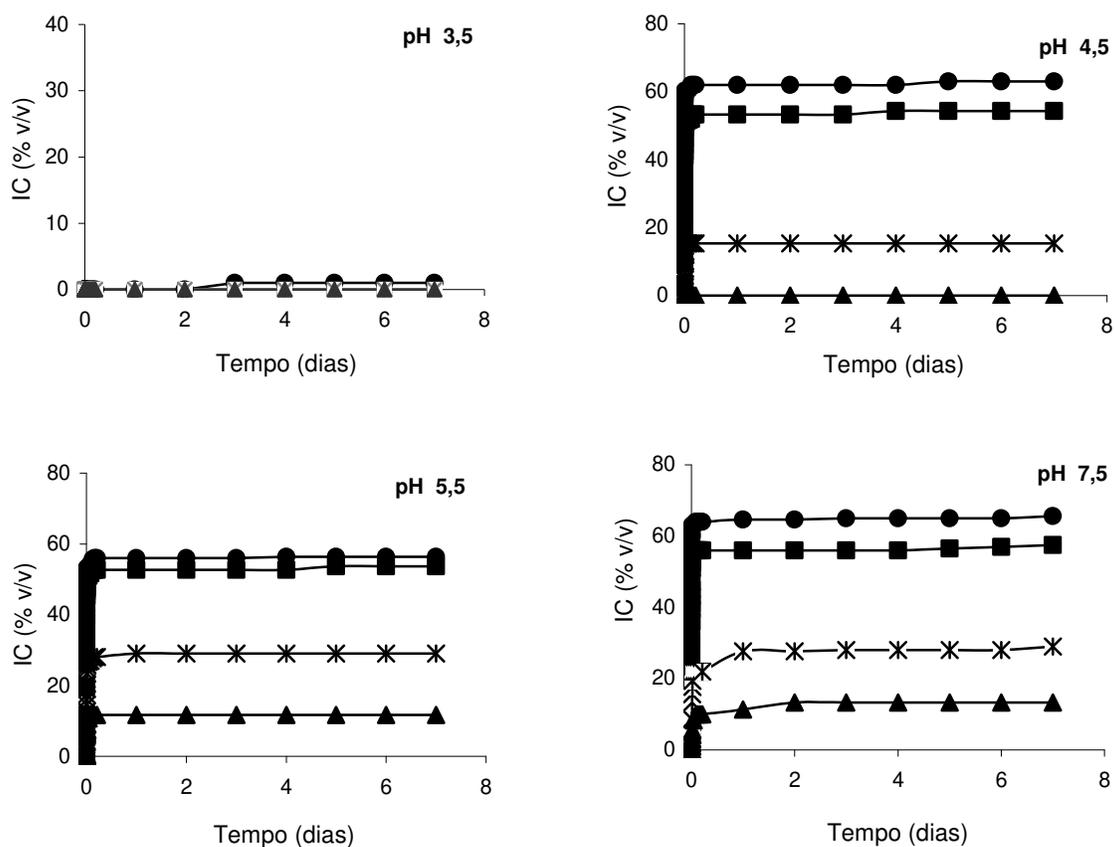


Figura 4.1. Efeito do pH e da concentração de proteína no índice de cremeação (IC) das emulsões estabilizadas por fibra de colágeno. Conteúdo de proteína: (●) 0,5 % (m/m), (■) 1 % (m/m), (*) 2 % (m/m), (▲) 3 % (m/m).

Tabela 4.2. Índice de cremeação das emulsões estabilizadas por pó de colágeno mensurado pelo volume da fase inferior em relação ao volume total (% v/v).

% proteína de pó de colágeno (m/m)	pH			
	3,5	4,5	5,5	7,5
1	56,67 ± 0,87	56,33 ± 1,67	64,00 ± 0,85	54,33 ± 0,15
2	1,00 ± 0,00	35,00 ± 0,00	37,50 ± 0,07	37,50 ± 0,07
3	0,00 ± 0,00	4,27 ± 0,93	16,67 ± 0,67	15,67 ± 0,45
4	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

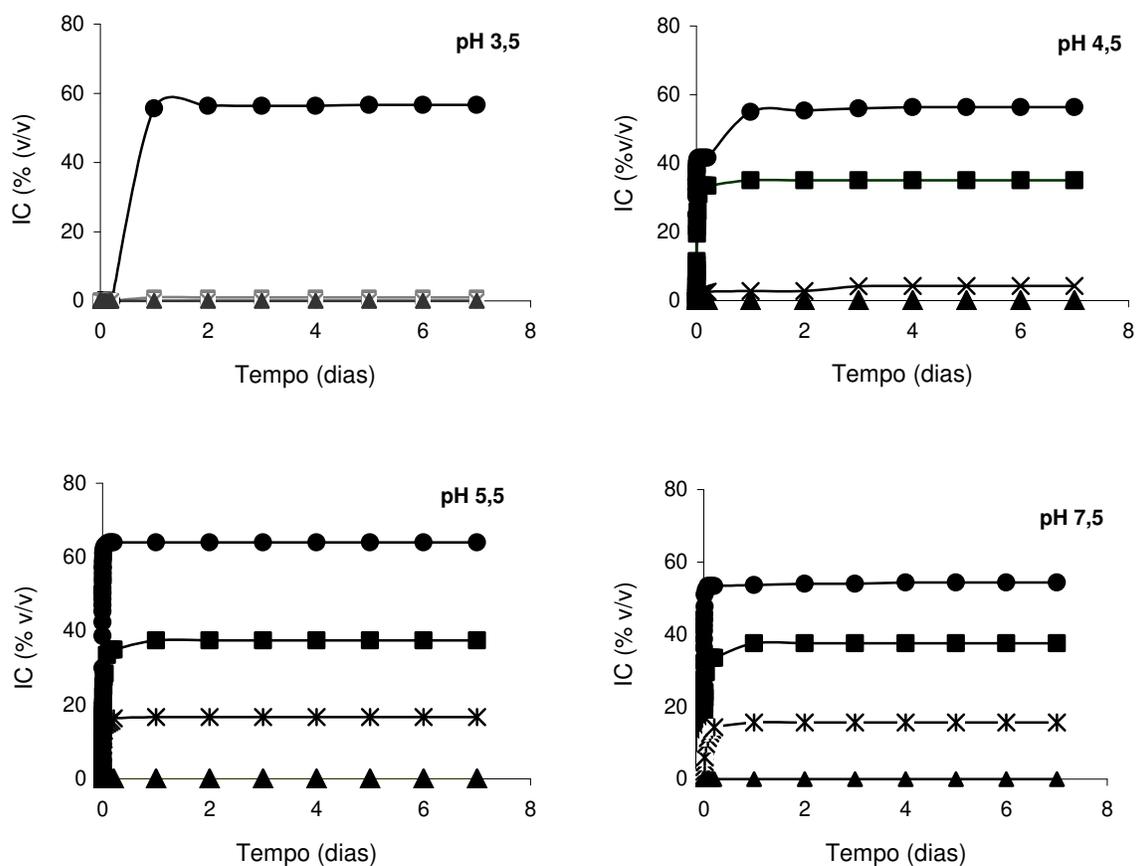


Figura 4.2. Efeito do pH e da concentração de proteína no índice de cremeação (IC) das emulsões estabilizadas por pó de colágeno. Conteúdo de proteína: (●) 1 % (m/m), (■) 2 % (m/m), (*) 3 % (m/m), (▲) 4 % (m/m).

A estabilidade foi maior em pH 3,5, não apresentando sinais de separação de fases em emulsões compostas por um conteúdo protéico igual ou superior a 1 % (m/m) de fibra de colágeno ou 3% (m/m) de pó de colágeno. Em pH baixo, pode ter ocorrido a hidrólise parcial do colágeno e esta modificação estrutural propiciaria uma melhor interação proteína-lipídio, promovendo também uma estabilidade eletrostática pela força de repulsão entre as gotas, a qual é determinada pela carga existente em sua superfície. Nas emulsões estabilizadas por proteínas, a superfície das gotas apresenta carga positiva quando o pH está abaixo do pI. Quando esta carga é suficientemente alta, ou seja, a um pH 3,5, condição mais distantes do pI do colágeno, entre 6,5 e 8,5 (NEKLYUDOV, 2003), existe forte repulsão eletrostática entre as gotas, impedindo que se agreguem. Já valores de pH próximos ao pI, os grupos carboxílicos são neutralizados, passando a existir interação atrativa entre as gotas (interações hidrofóbicas, eletrostáticas e forças de Van der Waals). Quando essa atração é suficientemente alta, ocorre uma agregação das partículas, podendo haver a formação de uma rede tridimensional (CHEN et al., 1999), que diminui a mobilidade das gotas e conseqüente coalescência. A partir das microscopias (Figuras 4.3 e 4.4), observou-se a formação desta rede em pH 7,5, 5,5 e alguns ensaios a pH 4,5 (Figura 4.5), mostrando que nessas condições houve predomínio das interações atrativas em relação às repulsivas.

4.1.2 Tamanho e distribuição de tamanho de gotas

As microscopias (Figuras 4.3 e 4.4) mostraram que as macro-emulsões eram polidispersas, ou seja, com diferentes tamanhos de gotas de óleo. A distribuição de tamanho e o diâmetro médio de gotas são um parâmetro muito importante para diversas propriedades das emulsões como, por exemplo, vida de prateleira, aparência, textura e aroma. Consequentemente é fundamental que se possa controlar e medir com precisão o tamanho das gotas em emulsões (MCCLEMENTS, 2005). O Ultra-Turrax, em comparação com outros métodos, como a homogeneização a alta pressão, não viabiliza a formação de pequenas gotas monodispersas. Parte da energia adicionada no processo é dissipada na forma de calor e não se obtém a energia livre adicional para criar uma grande área interfacial (ANTON, et al., 2008) e estabilizar cineticamente a emulsão. A partir das microscopias da fase superior das emulsões com fibra (Figura 4.4) fica evidente a diferenciação estrutural das emulsões em diferentes valores de pH. Em pH 3,5, condição mais distante do pI do colágeno, há a formação de uma verdadeira emulsão, ou seja, a dispersão de gotas em um meio aquoso, enquanto que em pH elevado, visualiza-se a estrutura de colágeno praticamente intacta, impedindo até mesmo a visualização das gotas de óleo e conseqüentemente a análise das imagens para o cálculo do diâmetro médio de gotas e distribuição de tamanho de gota. Consequentemente, fica evidente que a estabilização em altos pHs é viabilizada pela formação de uma rede que impede o movimento molecular das gotas.

A relação direta entre o índice de cremeação e o tamanho de gotas verificado por Perrechil (2008), que avaliou emulsões estabilizadas por caseinato de sódio, também foi verificada neste trabalho. O diâmetro médio (d_{32}) de gotas das emulsões foi menor em pHs

baixos e em altas concentrações de proteína (Tabelas 4.3 e 4.4), indicando um papel importante do colágeno na estabilidade das emulsões, ou melhor, no impedimento da coalescência das gotas de óleo, especialmente longe do pI. O diâmetro de gota (d_{32}) variou de 6,71 a 12,76 μm nas emulsões estabilizadas pela fibra e de 7,14 a 15,89 μm nas emulsões estabilizadas pelo pó de colágeno.

Tabela 4.3. Tamanho de gota d_{32} (μm) das emulsões estabilizadas por fibra de colágeno.

%proteína de fibra de colágeno (m/m)	pH			
	3,5	4,5	5,5	7,5
0,5	12,76 \pm 2,26 ^a	-	-	-
1	8,60 \pm 1,65 ^b	-	-	-
2	6,71 \pm 1,19 ^{bA}	9,88 \pm 1,36 ^{aB}	-	-
3	7,76 \pm 1,37 ^{bA}	11,71 \pm 1,56 ^{aB}	-	-

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras maiúsculas: diferenças entre os pHs para uma mesma concentração de proteína. Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína para um mesmo pH.

Tabela 4.4. Tamanho de gota d_{32} (μm) das emulsões estabilizadas por pó de colágeno.

% proteína de pó de colágeno (m/m)	pH			
	3,5	4,5	5,5	7,5
1	12,63 \pm 0,91 ^{aA}	18,22 \pm 3,16 ^{aB}	11,77 \pm 0,88 ^{abA}	14,66 \pm 2,55 ^{aAB}
2	9,38 \pm 1,04 ^{bA}	11,57 \pm 2,05 ^{bA}	11,74 \pm 2,85 ^{abA}	15,89 \pm 1,17 ^{aA}
3	7,21 \pm 1,42 ^{bA}	11,27 \pm 2,01 ^{bB}	13,60 \pm 1,38 ^{aB}	13,37 \pm 0,83 ^{abB}
4	7,14 \pm 0,95 ^{bA}	9,01 \pm 1,42 ^{cA}	10,41 \pm 1,32 ^{bB}	11,91 \pm 1,17 ^{bB}

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras maiúsculas: diferenças entre os pHs para uma mesma concentração de proteína. Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína para um mesmo pH.

Comparando os resultados de estabilidade, microscopia e tamanho de gotas, pode-se observar que o aumento do teor de proteína na solução inicial diminuiu o nível de separação de fases, assim como o tamanho de gotas, sendo fortemente influenciada pelo pH. Desta maneira, ambos os materiais aqui analisados, fibra e pó, possuem um elevado potencial como agente estabilizante de alimentos ácidos, o que não ocorre com a maioria das proteínas globulares, já que estas apresentam pI em valores de pH baixos, diferente do colágeno que possui pI próximo à neutralidade.

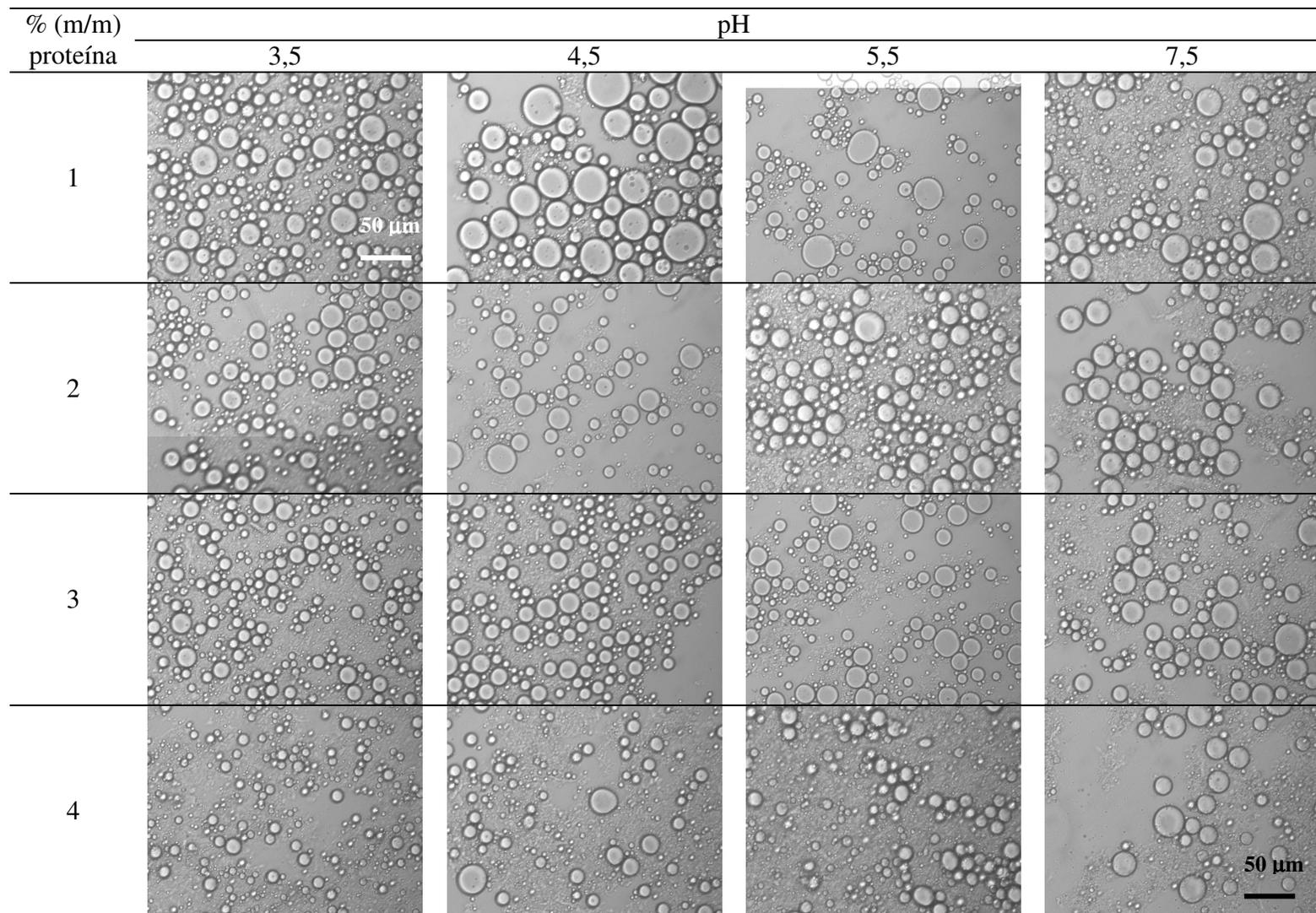


Figura 4.3. Micrografia das emulsões O/A com pó de colágeno e 10 % (m/m) de óleo. Barra da escala = 50μm.

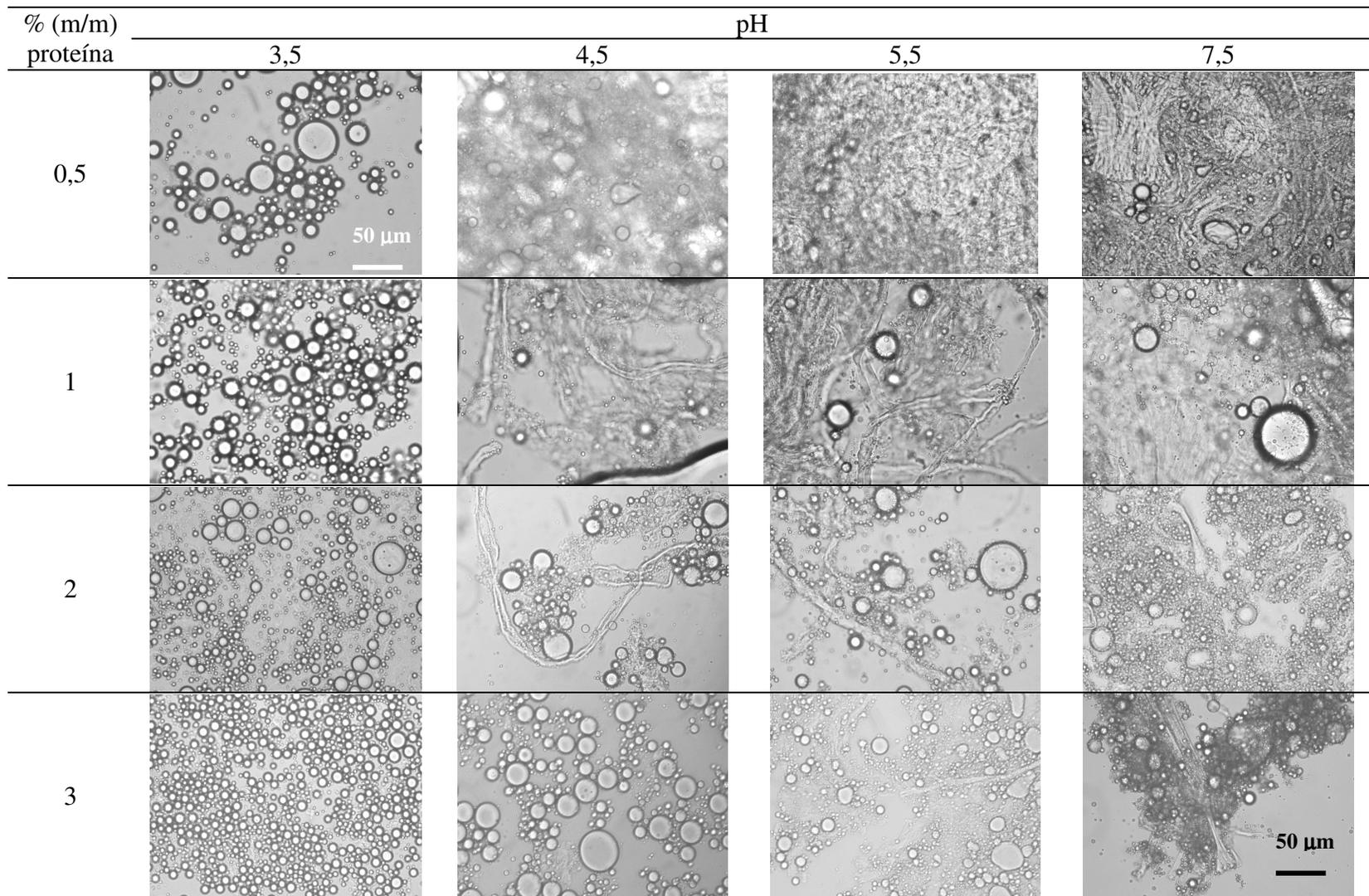


Figura 4.4. Micrografia das emulsões O/A com fibra de colágeno e 10 % (m/m) de óleo. Barra da escala = 50μm.

4.2. Micro-emulsões

O efeito da pressão de homogeneização e do número de passagens pelo homogeneizador foi avaliado em emulsões O/A compostas por 10 % (m/m) de óleo e 0,5 % (m/m) de proteína de fibra de colágeno não hidrolisada em pH 3,5, condição de pH onde o colágeno apresenta melhores propriedades estabilizantes. Após a etapa de homogeneização primária realizada com o auxílio do “Ultra-Turrax”, a homogeneização secundária foi realizada, sendo que a pressão no primeiro estágio variou de 200 a 1000 bar e no segundo estágio foi fixada em 50 bar. O objetivo da avaliação de diferentes pressões e passagens pelo homogeneizador foi reduzir o diâmetro médio das gotas de óleo dispersas no sistema de forma a aumentar a área interfacial óleo/água e, assim, permitir uma maior interação da interface com o componente emulsificante, podendo eventualmente produzir sistemas mais estáveis à separação de fases e com propriedades reológicas diferenciadas (MCCLEMENTS, 1999).

4.2.1. Estabilidade

O teste de estabilidade (Figura 4.5) em proveta mostrou que somente a emulsão homogeneizada a 200 bar/1 passagem apresentou separação de fases, com 10% (v/v) de índice de cremeação. A aparência desta emulsão foi diferenciada (Figura 4.6), sendo observado um sistema heterogêneo com fibras de colágeno visíveis a olho nu, enquanto que as demais emulsões não apresentaram sinais de separação por um período de até 7 dias e possuem aspecto mais homogêneo.

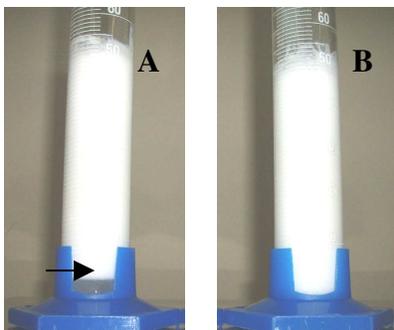


Figura 4.5. Separação de fases das emulsões após 7 dias de estocagem. A) emulsão homogeneizada a 200 bar/1 passagem e B) emulsão homogeneizada a 1000 bar/2 passagens.



Figura 4.6. Aparência da emulsão homogeneizada a 200 bar /1 passagem.

4.2.2. Tamanho e distribuição de tamanho de gotas

As microscopias apresentadas na Figura 4.7 mostraram que o aumento da pressão e do número de passagens pelo homogeneizador diminuíram o tamanho de gotas, assim como sua polidispersão. A redução do tamanho de partículas provocada pelo aumento de pressão gera um aumento da área interfacial, resultando numa maior disponibilidade de interação com o agente emulsificante. Nesse caso, as proteínas promoveriam uma repulsão eletrostática entre as gotas de óleo, impedindo o processo de floculação durante o tempo em que estas foram observadas. Já o aumento do número de passagens pelo homogeneizador aumenta o tempo de residência do emulsificante na válvula, viabilizando sua adsorção em

toda a nova área superficial gerada nas gotas, antes que elas colidam e coalesçam (FLOURY et al., 2000).

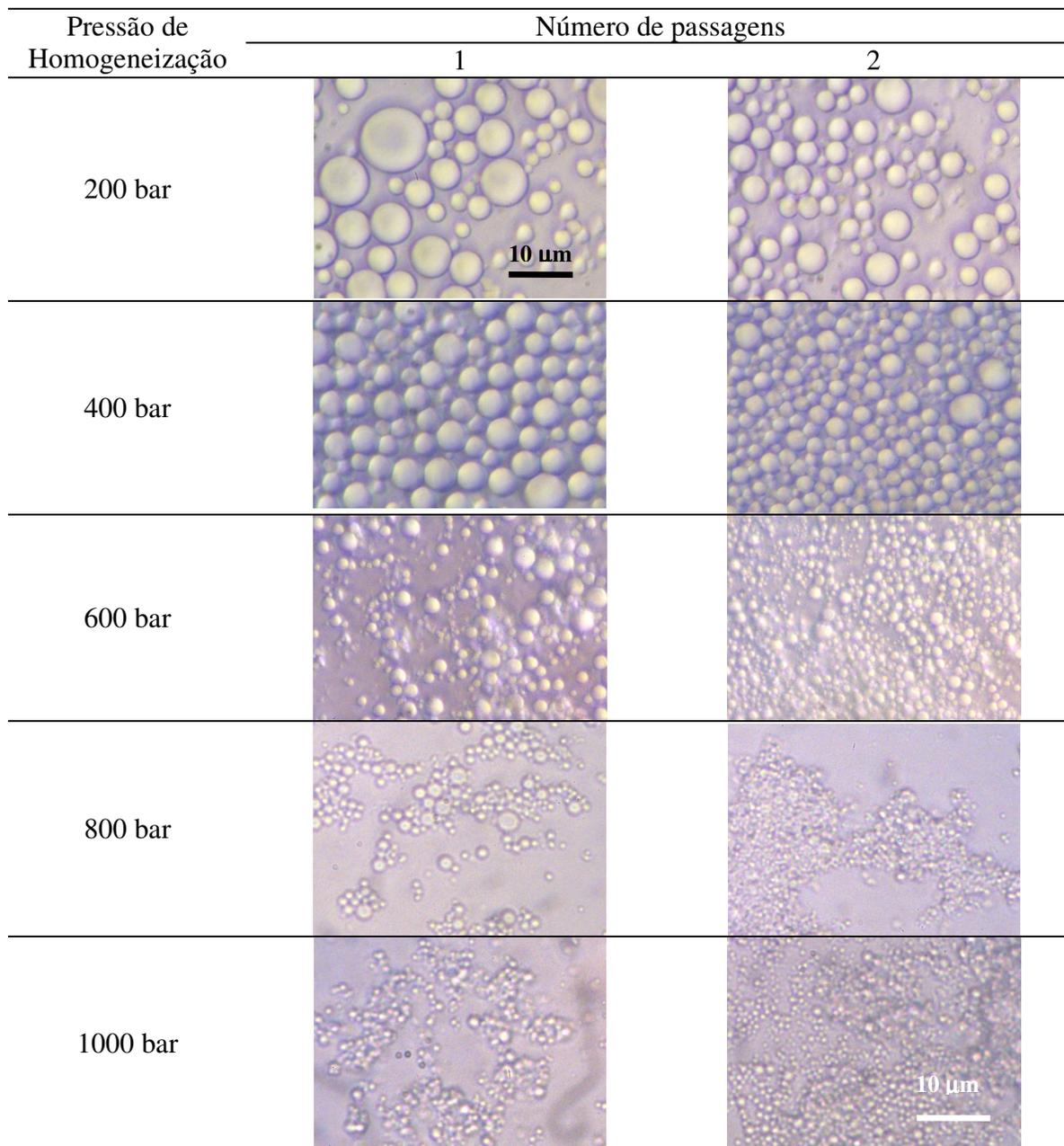


Figura 4.7. Micrografia das emulsões O/A com 0,5 % de proteína de fibra de colágeno. Barra da escala = 10 µm.

Como observado nas microscopias, o cálculo do diâmetro médio (d_{32}) e da mediana apresentado na Tabela 4.5 confirma a redução do tamanho das gotas com o aumento da pressão e do número de passagens pelo homogeneizador, sendo que o diâmetro médio d_{32} variou de 1,00 a 4,05 μm .

Tabela 4.5. Diâmetro médio (d_{32}) e mediana do tamanho de gotas das microemulsões estabilizadas por 0,5 % (m/m) de fibra de colágeno não hidrolisada.

Pressão (bar)	1 passagem		2 passagens	
	d_{32} (μm)	Mediana (μm)	d_{32} (μm)	Mediana (μm)
200	4,61 \pm 0,17 ^{Aa}	2,84 \pm 0,21 ^{Aa}	3,60 \pm 0,14 ^{Ab}	2,67 \pm 0,19 ^{Aa}
400	4,05 \pm 0,40 ^{Aa}	2,79 \pm 0,28 ^{Aa}	2,64 \pm 0,32 ^{Bb}	1,94 \pm 0,39 ^{Bb}
600	2,44 \pm 0,18 ^{Ba}	1,31 \pm 0,08 ^{Ba}	1,10 \pm 0,04 ^{Bb}	0,63 \pm 0,06 ^{Cb}
800	2,20 \pm 0,18 ^{Ba}	1,39 \pm 0,45 ^{Ba}	1,03 \pm 0,07 ^{Cb}	0,80 \pm 0,06 ^{Ca}
1000	1,39 \pm 0,07 ^{Ca}	0,84 \pm 0,42 ^{Ba}	1,00 \pm 0,09 ^{Cb}	0,83 \pm 0,08 ^{Ca}

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras maiúsculas: diferenças dentro da mesma coluna. Letras minúsculas: diferenças dentro da mesma linha.

Diversos estudos têm avaliado a proporcionalidade empírica do tipo lei da potência descrita por $d_{32} \propto P^m$, onde P é a pressão (bar) de homogeneização e d_{32} (μm) o diâmetro médio superficial. Dependendo da viscosidade dos materiais, do equipamento, das dimensões da válvula de homogeneização e da faixa de pressão utilizada, e conseqüentemente do tipo de escoamento, a constante m assumirá valores de 0,6 a 1, resultantes do escoamento turbulento ao laminar, respectivamente (FLOURY et al., 2003). Neste trabalho, obteve-se $m_1=0,71$ ($r^2=0,87$) e $m_2=0,90$ (Figura 4.8) para o ajuste dos dados de d_{32} nas emulsões que foram emulsificadas em 1 ou 2 passagens pelo homogeneizador, respectivamente. Walstra e Smulders (1997) obtiveram $d_{32} \propto P^{-0,9}$ para emulsões

homogeneizadas em pressões inferiores a 1500 bar e equipamento com válvula de homogeneização com dimensões similares à utilizada neste trabalho.

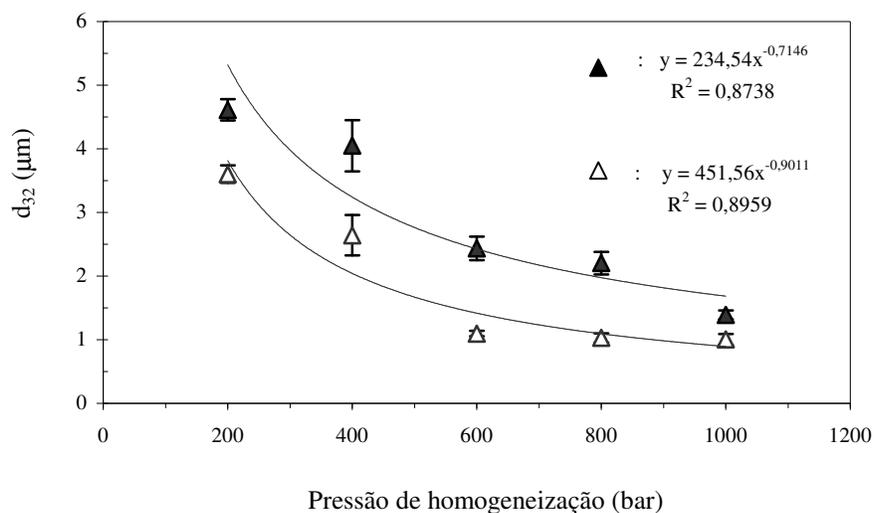


Figura 4.8. Tamanho médio de gota d_{32} em função do processo de homogeneização. Número de passagens no homogeneizador: (\blacktriangle) 1 passagem e (\triangle) 2 passagens.

Além da redução do diâmetro médio produzindo até mesmo gotas na escala submicrométrica, o aumento da pressão de homogeneização e do número de passagens pelo homogeneizador provocou uma redução da polidispersão do tamanho das gotas (Figura 4.9), observando, por exemplo, a concentração de gotas com d_{32} entre 0,5 e 1,4 μm em emulsões homogeneizadas a 1000bar/1passagem.

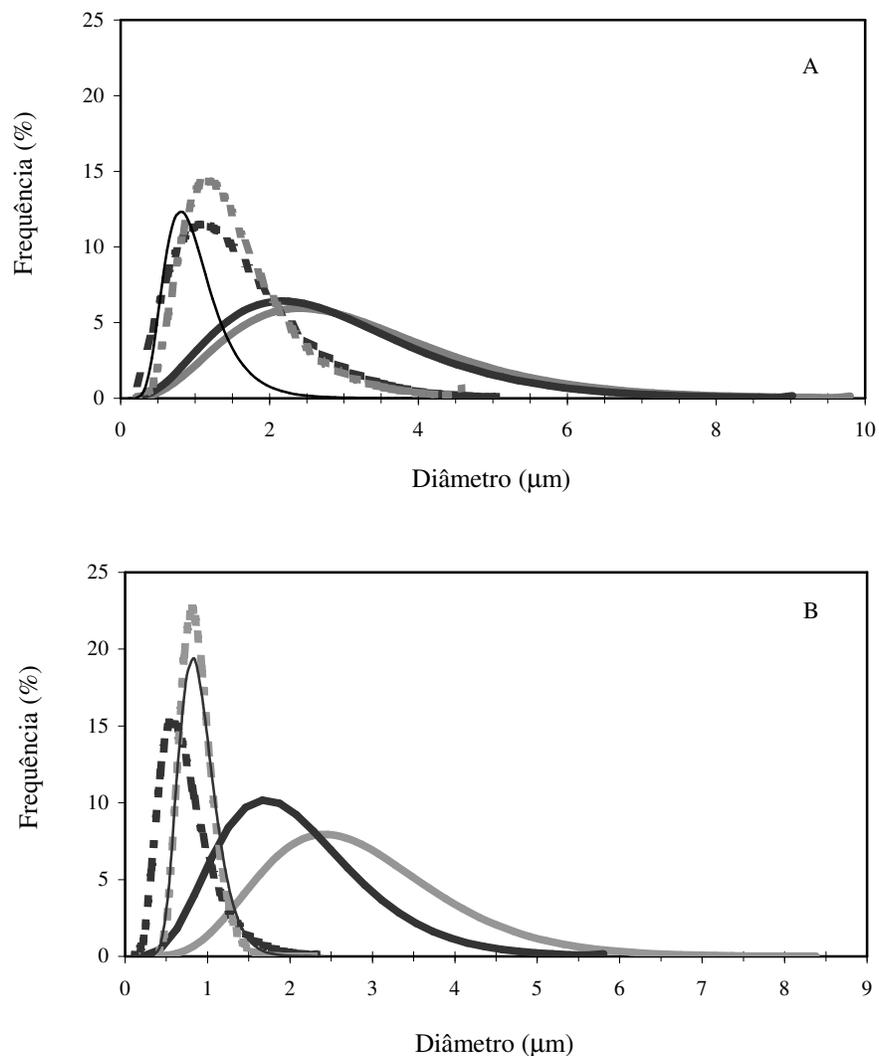


Figura 4.9. Evolução da distribuição do diâmetro de gota em função da pressão de homogeneização. Pressão (bar): (—) 1000, (---) 800, (-.-) 600, (—) 400 e (—) 200. Número de passagens pelo homogeneizador: (A) 1 passagem e (B) 2 passagens.

Apesar da redução no tamanho das partículas, as micrografias também sugerem indícios de que as gotas se flocularam e formaram agregados quando as emulsões foram homogeneizadas em pressões muito elevadas (800 e 1000 bar). Desta maneira, deve-se discutir efeitos secundários provocados pelo processo, já que o emulsificante utilizado é uma proteína, sensível à alta pressão e aumento de temperatura. Huppertz et al. (2002)

relatam que a estrutura primária de proteínas não é alterada em nenhum nível de pressão, porém, a alteração da estrutura secundária e de ligações de hidrogênio pode ocorrer em pressões muito altas e em geral são irreversíveis. Além disso, a estrutura terciária com suas ligações do tipo hidrofóbicas e iônicas em geral é modificada em níveis de pressão da ordem de 2000 bar, e a estrutura quaternária pode ser alterada em pressões de 1500 bar. Estudos anteriores verificaram que uma pressão de homogeneização de 3000 bar é capaz de desnaturar proteínas de soro, diminuindo suas propriedades estabilizantes em emulsões (FLOURY et al., 2000). Assim, a homogeneização a alta pressão pode ter rompido parcialmente a fibra de colágeno, expondo alguns grupos internos. Dessa forma, a proteína, ao recobrir a interface óleo/água, poderia apresentar uma menor carga, levando a um efeito de atração e aglomeração entre as gotas.

Além da desnaturação causada pela pressão, durante o processo de homogeneização a altas pressões, o intenso cisalhamento da emulsão contra as válvulas produz uma grande quantidade de energia mecânica que é parcialmente dissipada na forma de calor no fluido, aumentando sua temperatura, e conseqüentemente modificando a estrutura e/ou características de proteínas (HUMBERT et al., 1980; SANDRA & DALGLEISH, 2005). Segundo Datta et al. (2005), Sandra & Dalgleish (2005) e Hayes & Kelly (2003), o aumento de temperatura apresenta correlação linear com o aumento de pressão, o que também foi verificado neste trabalho (Figura 4.10). A temperatura máxima observada nas emulsões foi de 52°C na condição crítica de 1000 bar e 2 passagens pelo homogeneizador, ainda inferior à temperatura de início de desnaturação da fibra de colágeno, 58°C, que será posteriormente abordada na segunda parte deste trabalho. Outra justificativa para a ocorrência de floculação observada às altas pressões é a quantidade insuficiente de proteína

existente para recobrir a nova área superficial gerada entre os dois meios durante a redução do tamanho de gota (CORTÉS-MUÑOZ ET al., 2009).

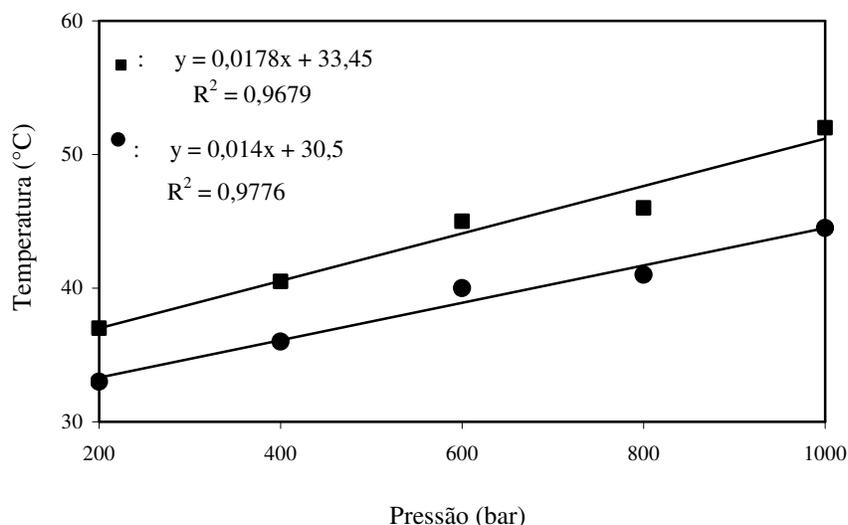


Figura 4.10. Efeito da pressão de homogeneização na temperatura da emulsão na saída do homogeneizador.

Número de passagens pelo homogeneizador: ●: 1 passagem, ■: 2 passagens.

4.2.3. Reologia

As curvas de escoamento em estado estacionário estão apresentadas na Figura 4.11, em que é observado um comportamento de fluido pseudoplástico, onde $n < 1$, sendo n o índice de comportamento. A viscosidade aparente diminuiu com o aumento da taxa de deformação aplicada, sendo este o comportamento mais comum para a maioria das emulsões alimentícias. Neste caso a pseudoplasticidade pode ocorrer por uma variedade de razões como, por exemplo, a alteração da distribuição espacial devido à aplicação de cisalhamento, alinhamento de gotas não esféricas, remoção de moléculas de solventes ligados às gotas, ou deformação e rompimento de flocos (HUNTER, 1993; MEWIS &

MACOSKO, 1994; NEWSTEIN et al., 1999). Adicionalmente, observa-se a existência de uma pequena tensão residual (σ_0) em algumas condições de homogeneização, capaz de oferecer resistência ao escoamento a baixas deformações, justificando, portanto, o ajuste do modelo Herschel-Bulkley (HB) aos dados (Figura 4.12), o qual forneceu um $R^2 > 0,999$ em todos os sistemas estudados.

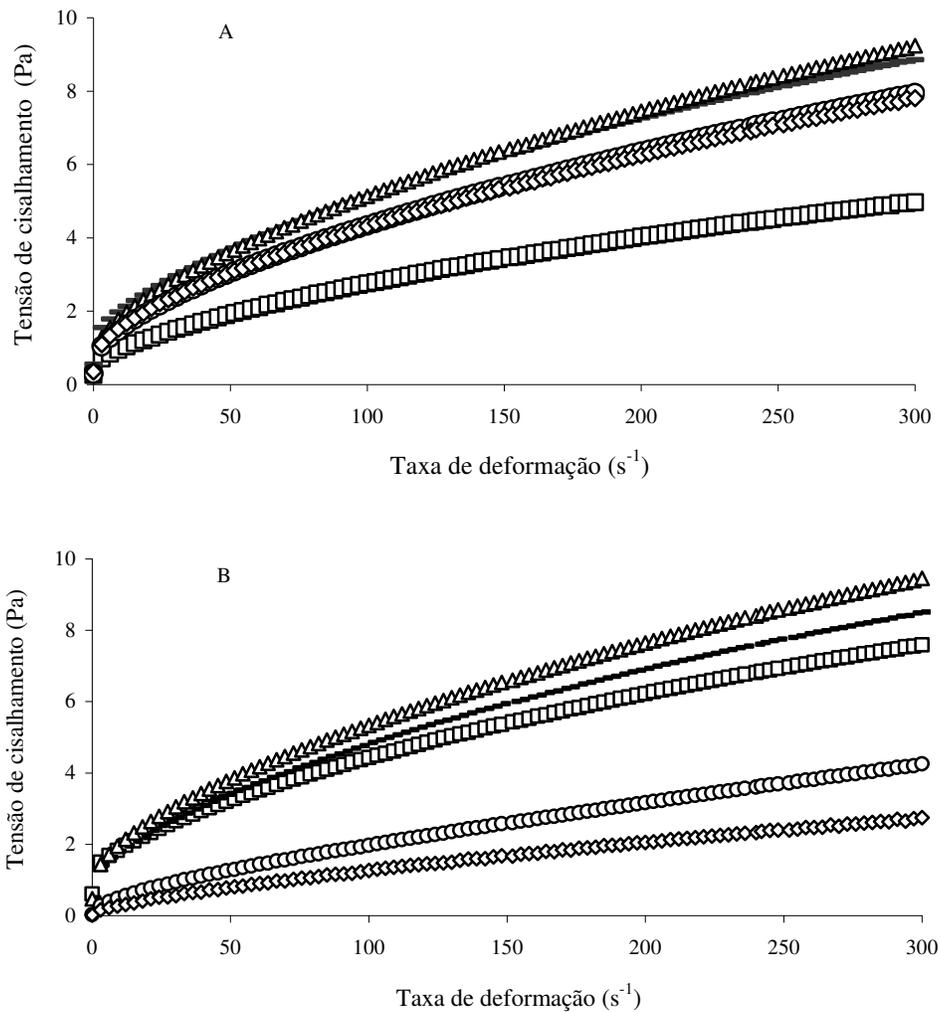


Figura 4.11. Efeito da pressão de homogeneização nas curvas de escoamento das emulsões compostas por 0,5% m/m de proteína de fibra de colágeno e 10% (m/m) de óleo de soja. Pressão de homogeneização (bar): 200 (\square), 400 (-), 600 (Δ), 800 (o) e 1000 (\diamond). Número de passagens pelo homogeneizador: (A) 1 passagem e (B) 2 passagens.

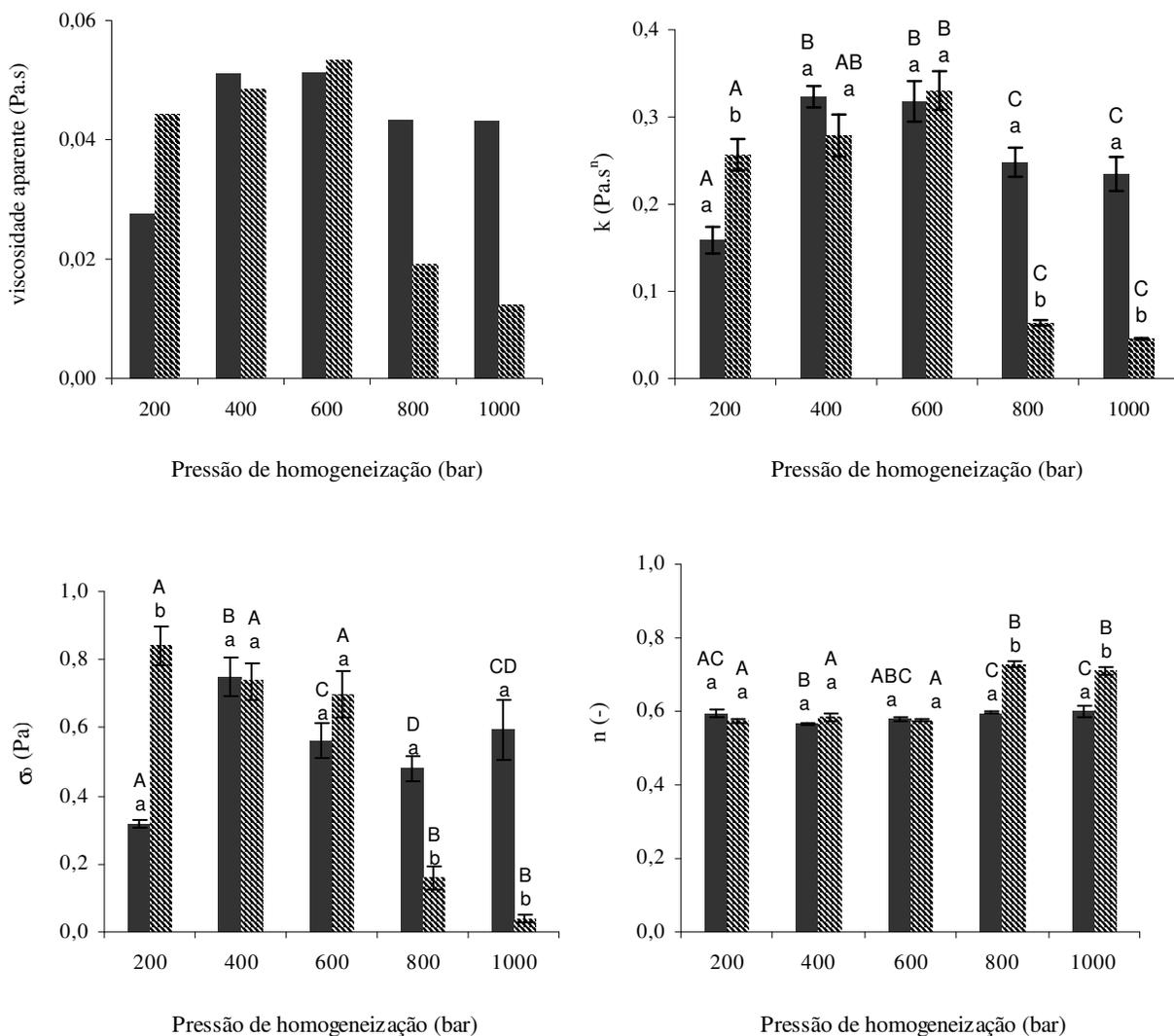


Figura 4.12. Parâmetros ajustado pelo modelo HB e viscosidade aparente a 100 s^{-1} . ■: 1 passagem pelo homogeneizador, ▨: 2 passagens pelo homogeneizador. Letras minúsculas diferentes em cada pressão de homogeneização e letras maiúsculas diferentes em emulsões com mesmo número de passagens pelo homogeneizador indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$).

Nas condições de homogeneização de 200 a 600 bar, o índice de consistência e a viscosidade tenderam a aumentar com a pressão e o número de passagens (Figuras 4.12 e

4.13), favorecendo a quebra das gotas através do aumento de cisalhamento na válvula e limitando a colisão e consequente reaglomeração e coalescência (CORTÉS-MUÑOZ et al., 2009). O aumento da viscosidade com a pressão e o número de passagens também foi reportado por Cortés-Munõz et al. (2009), que avaliaram emulsões estabilizadas por proteínas do soro. Neste caso, a diminuição no tamanho das gotas com o aumento da pressão (Figura 4.8) provavelmente resultou em maior interação entre as gotas, levando à elevação da viscosidade dos sistemas. A partir de 600 bar, o índice de comportamento k e a viscosidade aparente mudaram de comportamento, decrescendo com a pressão de homogeneização e o número de passagens, comportamento similar ao observado por Floury et al. (2003), que avaliaram emulsões estabilizadas por metil-celulose. Os valores de índice de comportamento (n) foram maiores nas pressões de homogeneização elevadas, diminuindo a pseudoplasticidade destas emulsões. Quanto à tensão residual (σ_o), observou-se que a emulsão homogeneizada a 200 bar/1passagem apresentou σ_o pequeno, o que poderia explicar seu elevado índice de cremeação observado no teste de estabilidade. Além disso, houve uma tendência de menores valores de σ_o com o aumento da pressão de homogeneização. Esta baixa viscosidade e tensão residual observada na emulsão homogeneizada a 200 bar e uma passagem (Figuras 4.12 e 4.13) podem ser explicadas pela sua estrutura. Visualmente observou-se que a água não estava intimamente ligada ao óleo ou à fibra (Figura 4.6), podendo ter ocorrido a separação de fases durante o ensaio, levando a um baixo valor de viscosidade.

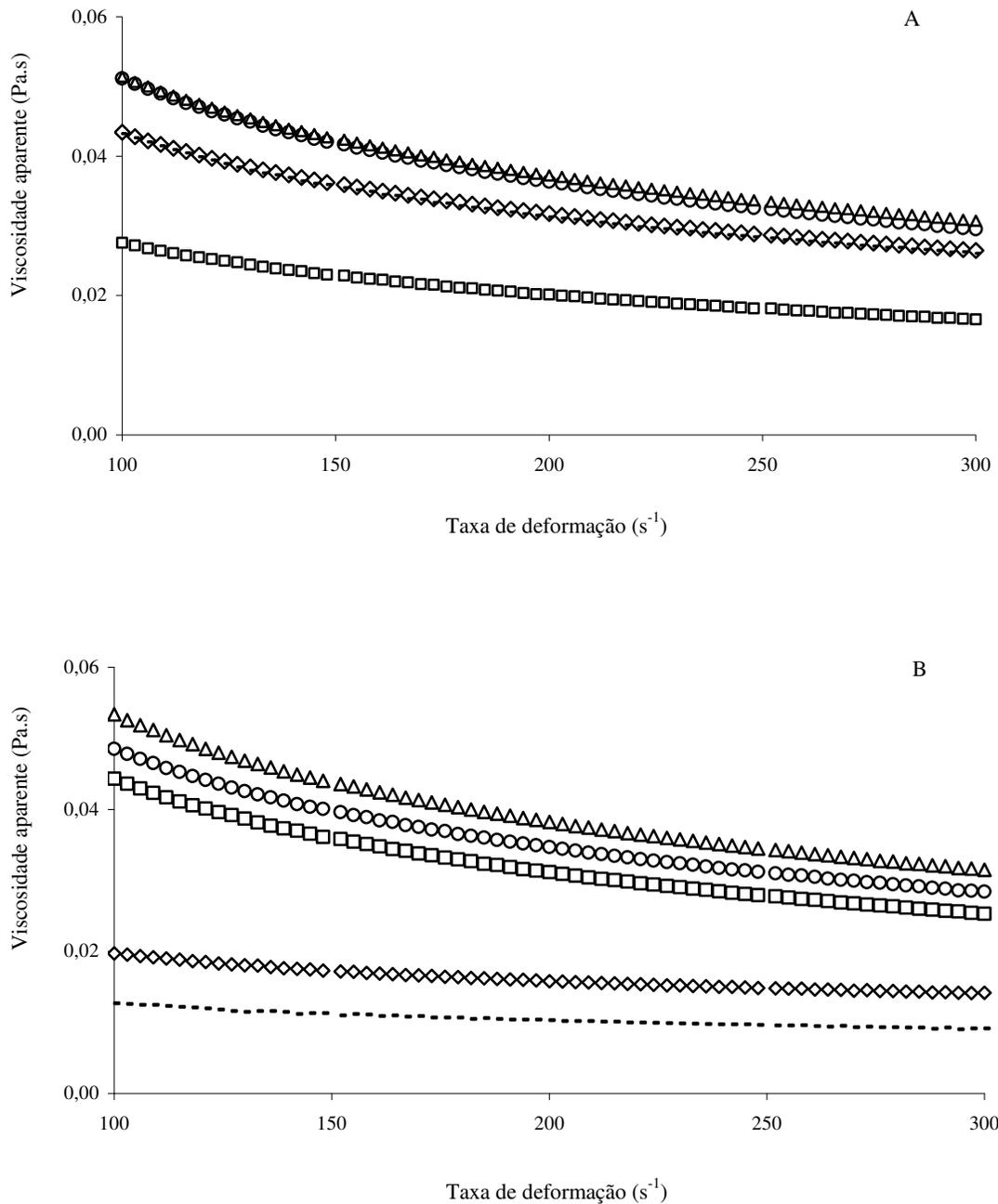


Figura 4.13. Efeito da pressão de homogeneização na viscosidade aparente das emulsões. Pressão: 200 (□), 400 (○), 600 (△), 800 (◇), 1000 bar (-). Número de passagens pelo homogeneizador: (A) 1 passagem e (B) 2 passagens.

As propriedades viscoelásticas das emulsões estão apresentadas nas Figuras 4.14 e 4.15, sendo que o módulo elástico (G') foi maior que o módulo viscoso (G'') em função da

frequência para todos os sistemas estudados. Este comportamento é típico de soluções concentradas com algum grau de elasticidade. Observa-se que o módulo complexo G^* possui valores menores quando a pressão de homogeneização aumenta. Os efeitos mais detalhados da pressão de homogeneização e do número de passagens pelo homogeneizador nas propriedades viscoelásticas das emulsões estão apresentados nas Tabelas 4.6 e 4.7. Os valores de G' e G'' foram obtidos em uma condição fixa de frequência, 1 Hz, enquanto que a dependência de G' e G'' em relação à frequência (ω) foi analisada a partir do ajuste de uma equação do tipo lei da potência aos dados de G' e G'' (G' ou $G'' \propto \omega^n$).

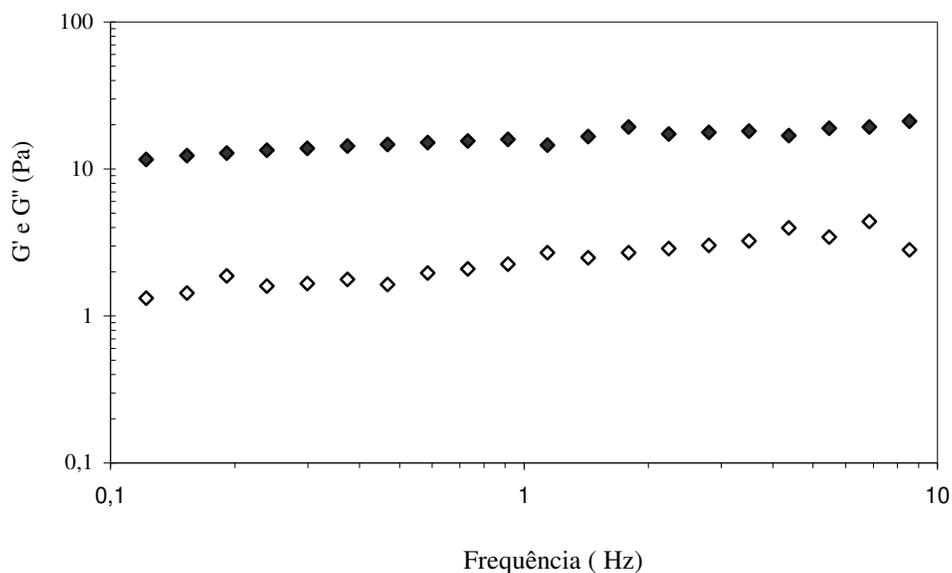


Figura 4.14. Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento típico das emulsões homogeneizadas a alta pressão. Módulo elástico G' (◆) e módulo viscoso G'' (◇).

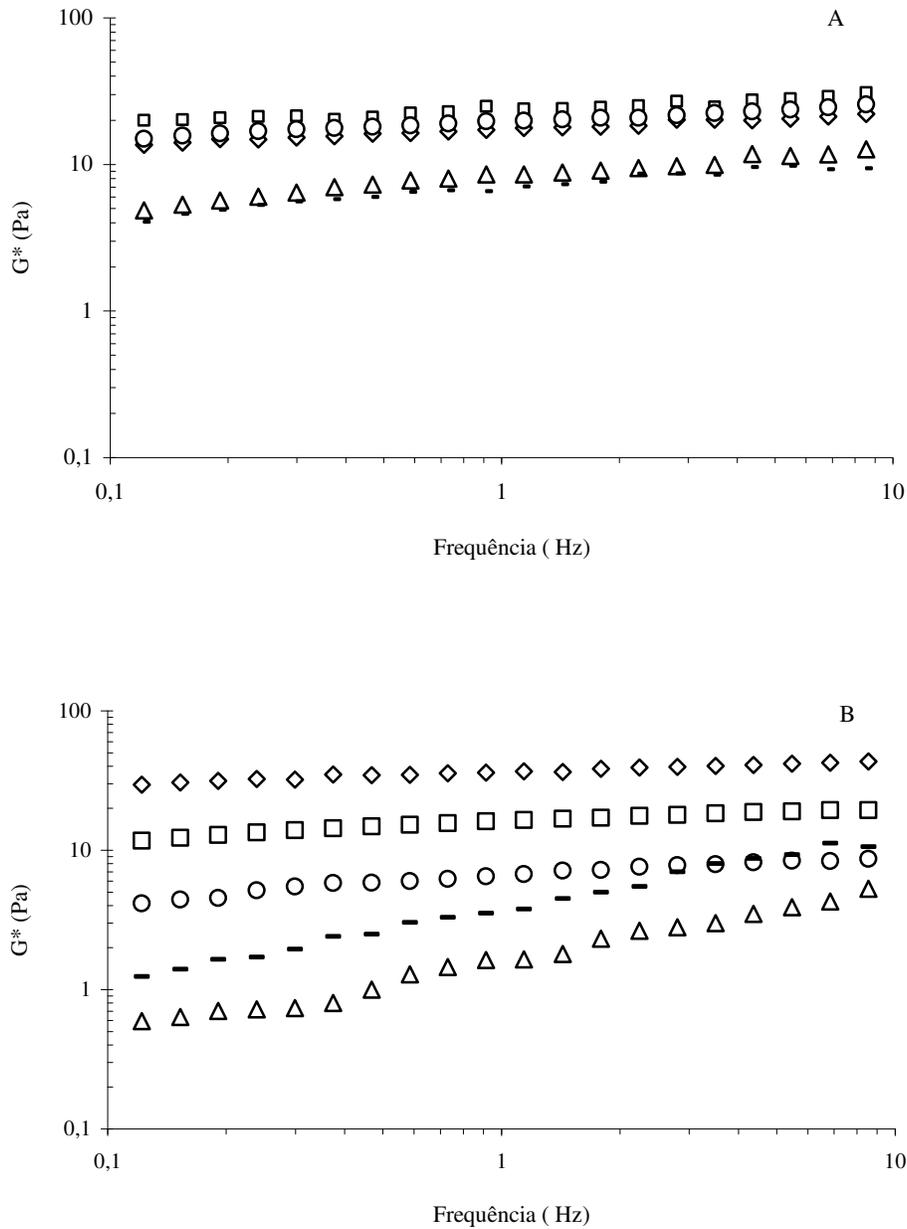


Figura 4.15. Influência da pressão de homogeneização e número de passagens no módulo complexo (G^*) das emulsões compostas por 0,5% m/m de proteína e 10 % (m/m) de óleo. Pressão: 200 (\diamond), 400 (\square), 600 (\circ), 800 (Δ) e 1000 bar ($-$). Número de passagens pelo homogeneizador: (A) 1 passagem e (B) 2 passagens.

A emulsão homogeneizada a 200 bar/1passagem apresentou módulos complexo (G^*) e de armazenamento (G') a 1 Hz menores que a emulsão homogeneizada em 200

bar/2 passagens, além de apresentar uma maior dependência de G' em relação à frequência, quando comparada com as emulsões homogeneizadas a 400 e 600 bar. Estes resultados confirmam o comportamento de viscosidade e a instabilidade observada no ensaio de estabilidade, o que estaria associado a uma estrutura menos rígida permitindo a mobilidade das gotas e a separação de fases. Comparando-se as demais pressões (400 a 1000 bar), observa-se que com aumento da pressão e do número de passagens pelo homogeneizador, os valores de G^* , G' e G'' tendem a ser menores e mais dependentes da frequência, o que significa a formação de emulsões menos estruturadas, consequência do rompimento da fibra de colágeno e das gotas de óleo.

Tabela 4.6. Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') obtidos em frequência de 1 Hz em ensaios oscilatórios de emulsões estabilizadas por fibra de colágeno não hidrolisada e homogeneizadas a alta pressão.

Pressão (bar)	1 passagem		2 passagens	
	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)
200	14,83 ^{aA}	2,24 ^{aA}	26,80 ^{aB}	3,11 ^{aA}
400	18,15 ^{aA}	2,31 ^{aA}	17,18 ^{bA}	2,33 ^{aA}
600	16,07 ^{aA}	2,55 ^{aA}	6,82 ^{cB}	1,29 ^{bB}
800	6,24 ^{bA}	1,57 ^{aA}	2,61 ^{cB}	0,82 ^{bA}
1000	5,23 ^{bA}	0,98 ^{bA}	3,56 ^{cA}	0,70 ^{bA}

Diferentes letras significam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras minúsculas comparam valores dentro da mesma coluna, e letras maiúsculas comparam valores de G' ou G'' , separadamente, dentro da mesma linha da tabela.

Tabela 4.7. Coeficiente n obtido pelo ajuste da lei da potência aos log de G' e G'' em função do log da frequência, em ensaios realizados em emulsões estabilizadas por fibra de colágeno não hidrolisada e homogeneizadas a alta pressão.

Pressão	1 passagem		2 passagens	
	n, G'	n, G''	n, G'	n, G''
200	0,21 ^{aA}	0,27 ^{aA}	0,12 ^{aB}	0,21 ^{aA}
400	0,13 ^{bA}	0,22 ^{aA}	0,13 ^{aA}	0,24 ^{aA}
600	0,14 ^{bA}	0,23 ^{aA}	0,17 ^{aB}	0,28 ^{aA}
800	0,22 ^{aA}	0,41 ^{aA}	0,43 ^{bB}	0,30 ^{aA}
1000	0,18 ^{abA}	0,31 ^{aA}	0,53 ^{bB}	0,53 ^{aA}

Diferentes letras significam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras minúsculas comparam valores dentro da mesma coluna e letras maiúsculas comparam valores de G' ou G'' , separadamente, na mesma linha da tabela.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Parte 2. Propriedades físico-químicas da fibra de colágeno não hidrolisado e da fibra de colágeno parcialmente hidrolisada.

Com o intuito de modificar as propriedades funcionais da fibra de colágeno e particularmente obter características emulsificantes e/ou estabilizantes, este ingrediente foi parcialmente hidrolisado em temperatura variando de 50°C a 85°C por 20 a 60 minutos, sendo caracterizado quanto ao seu perfil eletroforético, solubilidade em água em função do pH e calorimetria.

4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a hidrólise, as dispersões de fibra tiveram suas frações solúvel e insolúvel separadas por centrifugação, sendo então analisadas separadamente por eletroforese em gel de poliacrilamida, capaz de avaliar a distribuição de massa molar da proteína. A massa molar do colágeno é de aproximadamente 300 kDa, sendo constituído por 3 cadeias aminoacídicas que formam a tripla hélice (ZHANG, et al, 2009). Todas as amostras apresentaram duas bandas α (α_1 e α_2) de massa molar ao redor de 90 e 100 kDa. Já a banda β de massa molar próxima a 180 kDa não esteve presente nas frações solúveis dos hidrolisados a 65 °C e 85°C/60min (Figura 4.16 e 4.17). Observaram-se também bandas de massa molar elevada principalmente nas frações insolúveis, denominadas componentes γ (ZHANG et al, 2009).

Além disso, foi verificado um arraste de moléculas de menor massa molar nas frações insolúveis dos hidrolisados a 85°C. Já as frações solúveis apresentaram frações molares mais diferenciadas. Com o aumento da temperatura e o tempo de hidrólise, houve a produção de frações protéicas de menor massa molar, sendo que os tratamentos submetidos a 65°C/20min, 65°C/60min e 85°C/20min originaram um arraste de moléculas até 49 kDa, e a hidrólise a 85°C/60min produziu um arraste de moléculas de massa molar até 37 kDa.

Os hidrolisados a 50°C não apresentaram variação perceptível em relação ao colágeno não hidrolisado, apresentando ambos um arraste de moléculas com massa molar superior a 64 kDa.

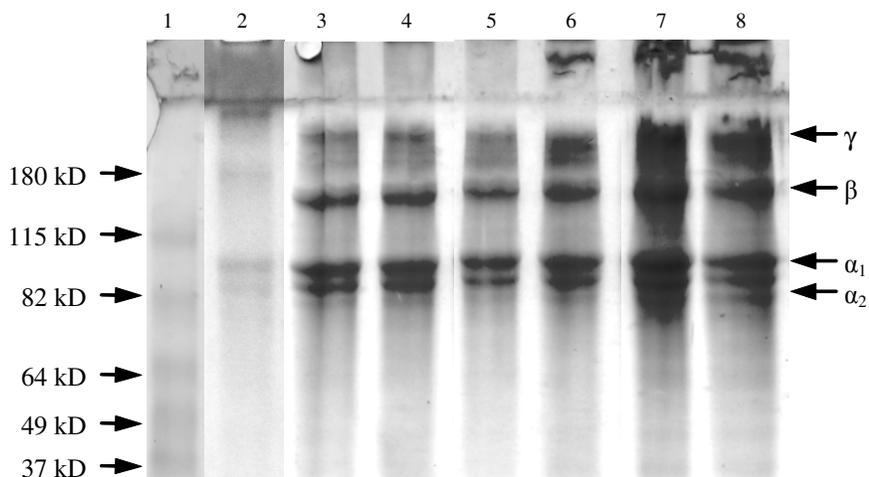


Figura 4.16. Eletroforese SDS-PAGE da fração insolúvel da fibra de colágeno não hidrolisada e parcialmente hidrolisada. (1) marcador molar, (2) colágeno não hidrolisado, colágeno hidrolisado (3) 50°C/20min, (4) 50°C/60min, (5) 65°C/20min, (6) 65°C/60min, (7) 85°C/20min e (8) 85°C/60min.

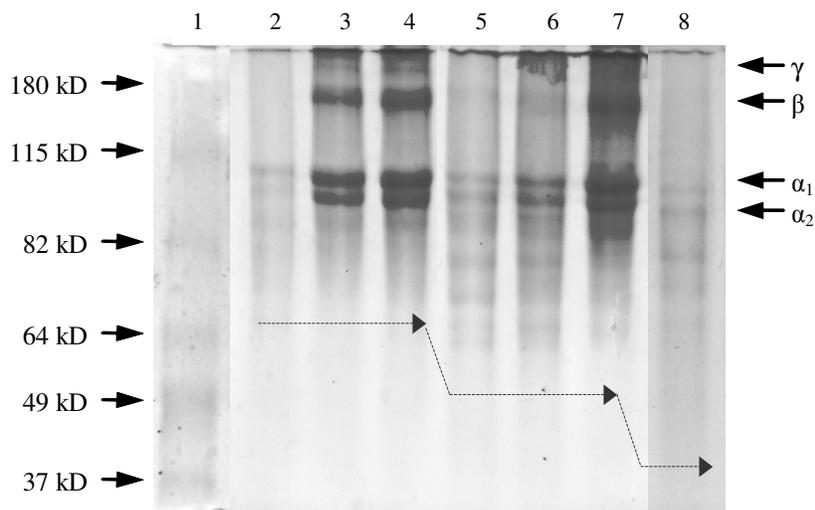


Figura 4.17. Eletroforese SDS-PAGE da fração solúvel da fibra de colágeno não hidrolisada e parcialmente hidrolisado. (1) marcador molar, (2) colágeno não hidrolisado, colágeno hidrolisado (3) 50°C/20min, (4) 50°C/60min, (5) 65°C/20min, (6) 65°C/60min, (7) 85°C/20min e (8) 85°C/60min.

4.4. Solubilidade

A fibra não hidrolisada possui somente 2,9 % (m/m) de proteínas solúveis quando dispersa em água em pH natural, (próximo de 9), solubilidade considerada baixa quando comparada a de outras proteínas utilizadas como emulsificantes, como o isolado protéico de soja que apresenta de 85 a 91,4% (m/m) de solubilidade (MORR et al, 1985). Com o processo de hidrólise, a solubilidade da fibra de colágeno aumentou gradativamente (Figura 4.18), variando de 15 % (m/m) de proteína solúvel na fibra hidrolisada a 50°C/20min para 33 % (m/m) para a proteína submetida a 85°C/60min. A temperatura favorece a quebra das ligações de hidrogênio e demais interações que estabilizam a tripla-hélice do colágeno, propiciando a abertura da estrutura e a exposição de grupos hidroxila e conseqüentemente a hidratação da proteína (ALVES & FERREIRA, 2002).

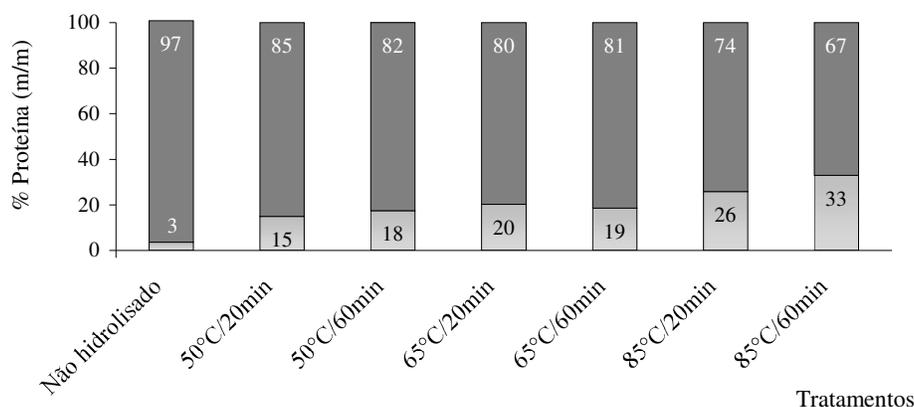


Figura 4.18. Efeitos dos tratamentos térmicos na composição de proteína solúvel (■) e insolúvel (■).

A solubilidade da fibra de colágeno em água variou com o pH (Figura 4.19), principalmente em pHs inferiores a 4,5, quando houve a tendência de aumento da solubilidade. Em baixos valores de pH, os íons de hidrogênio interagem com a fibra de

colágeno modificando a polaridade superficial (BOKI & KAWASAKI, 1994) e provavelmente, viabilizando o acesso da água à estrutura da fibra e aumentando sua solubilidade. É possível identificar que entre os pHs 4,5 e 8,5 existe uma menor solubilidade, caracterizando seu ponto isoelétrico (pI), conforme descrito por Neklyudov (2003). A partir do ajuste dos dados de solubilidade versus pH a uma função polinomial de segundo grau, foi identificado o ponto mínimo de solubilidade correspondente ao ponto isoelétrico (Figura 4.20). Existe uma tendência de redução do ponto isoelétrico com o aumento da hidrólise, provavelmente em função do perfil eletroforético descrito no item 4.3, contendo moléculas de diferentes massas molar e com novos grupos funcionais expostos. A solubilidade do pó de colágeno, matéria-prima também utilizada como emulsificante/estabilizante em emulsões deste projeto, foi estudada por Wolf et al. (2009), que encontrou uma variação de 28,9 a 52,5 % (m/m) de proteínas solúveis, em uma faixa de pH entre 2 e 12, sendo que a menor solubilidade foi encontrada em pH 8. Sua elevada solubilidade se deve, provavelmente, ao seu perfil eletroforético, composto pela banda β e frações de menor massa molar, entre 37 e 82 kDa (MÁXIMO E CUNHA, 2008).

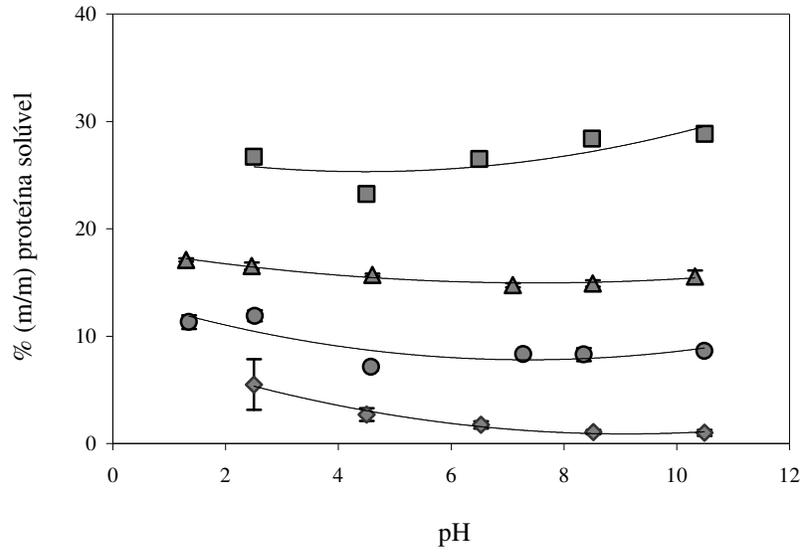


Figura 4.19. Variação da solubilidade do colágeno em função do pH e dos tratamentos térmicos. Tratamentos: (◆) fibra não hidrolisada, (●) 50°C/20min, (▲) 65°C/20min e (■) 85°C/60min.

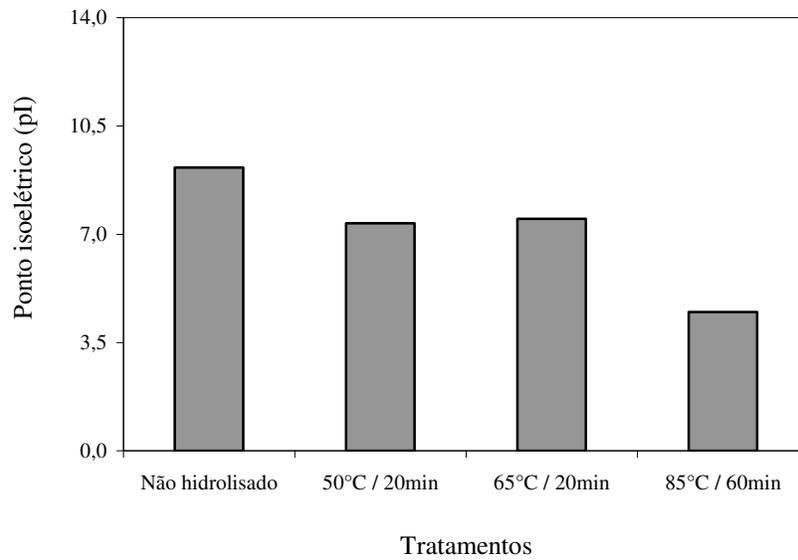


Figura 4.20. Ponto isoeletrico identificado para a fibra de colágeno não hidrolisada e fibra parcialmente hidrolisada.

4.5. Calorimetria

Termogramas demonstrativos do pó de colágeno, da fibra de colágeno não hidrolisada e dos hidrolisados da fibra de colágeno obtidos através de calorimetria diferencial de varredura estão apresentados na Figura 4.21, sendo os picos endotérmicos associados ao processo de desnaturação das proteínas que constituem o colágeno. As análises mostraram que as proteínas do pó de colágeno e da fibra de colágeno submetida aos tratamentos térmicos em temperaturas de 65°C e 85°C estavam completamente desnaturadas, não sendo identificado nenhum pico nas análises. Já a fibra não hidrolisada e a fibra parcialmente hidrolisada a 50°C/20min e 50°C/60min mostraram temperatura inicial do processo de desnaturação (T_{onset}) estatisticamente iguais, em torno de 58°C (Tabela 4.8). Já a temperatura de desnaturação (T_{desn}) encontrou-se entre 63,54 e 64,57 °C, e a entalpia entre 9,0 e 16,7 J/g proteína. As diferenças estatísticas observadas na T_{desn} e ΔH podem ser consequência da pequena quantidade de calor absorvido levando a menor precisão na medidas. A fibra de colágeno apresentou temperatura de desnaturação elevada quando comparada à de colágeno extraído de peixes, que está entre 15°C a 29°C (ZHANG et al, 2009), já que a composição aminoacídica, do colágeno, principalmente de prolina e hidroxiprolina, é dependente da origem animal e é constantemente associadas à estabilidade estrutural do colágeno (ZHANG et al., 2009).

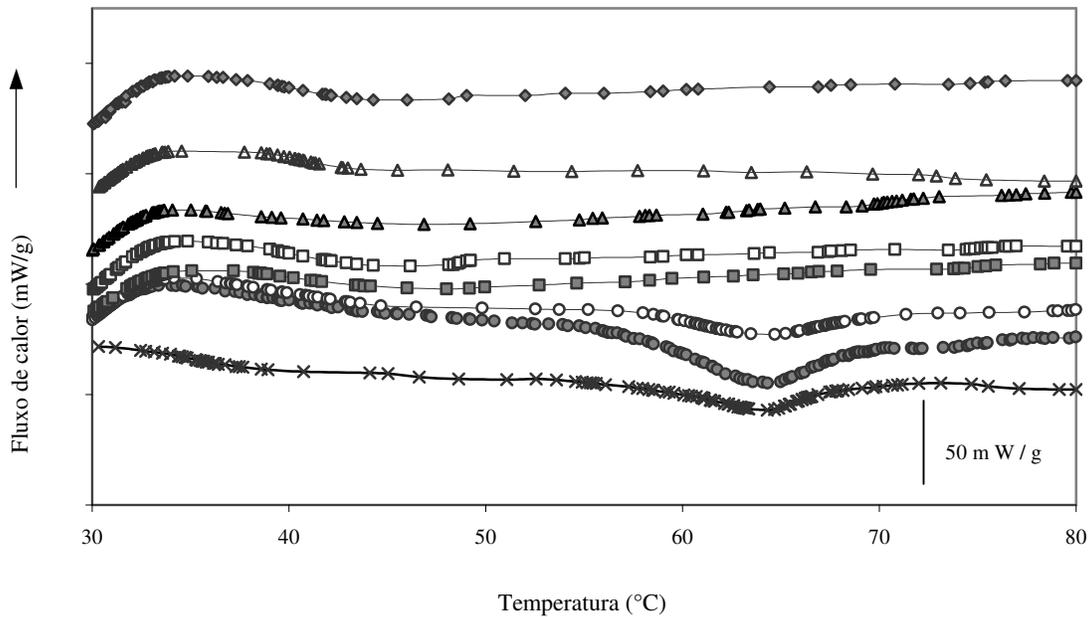


Figura 4.21. Curvas de desnaturação da fibra de colágeno. Amostras: (◆) pó de colágeno, (x) fibra não hidrolisada, hidrolisados (●) 50°C/20min, (○) 50°C/60min, (■) 65°C/20min, (□) 65°C/60min, (▲) 85°C/20min, (Δ) 85°C/60min.

Tabela 4.8. Temperatura de desnaturação (T_{desn}), temperatura de início de desnaturação (T_{onset}) e entalpia (ΔH) da fibra de colágeno não hidrolisada e parcialmente hidrolisada.

Tratamento	T_{onset} (°C)	T_{desn} (°C)	ΔH (J/g de proteína)
fibra não hidrolisada	$58,10 \pm 0,87^a$	$63,54 \pm 0,53^a$	$10,1 \pm 0,13^a$
50°C/20min	$58,08 \pm 0,61^a$	$64,15 \pm 0,24^{ab}$	$16,7 \pm 0,28^b$
50°C/60min	$58,15 \pm 0,35^a$	$64,57 \pm 0,28^b$	$9,0 \pm 0,16^a$

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Parte 3. Emulsões estabilizadas por fibra de colágeno parcialmente hidrolisada

4.6. Macro-emulsões

Macro-emulsões homogeneizadas em Ultra-Turrax e estabilizadas por 1% (m/m) de fibra de colágeno parcialmente hidrolisada em temperaturas variando de 50°C a 85°C por 20 a 60 minutos foram avaliadas em diferentes valores de pH e conteúdos de proteína solúvel.

4.6.1. Efeito da hidrólise térmica do colágeno e do pH

Macro-emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado em pH ajustado para 3,5 e em pH não ajustado, naturalmente encontrado próximo a 9,2 foram avaliadas quanto à estabilidade à separação de fases, composição das fases separadas e diâmetro de gota.

4.6.1.1. Estabilidade

Todas as emulsões apresentaram separação de fases após 7 dias de estocagem (Figura 4.22), com a formação de pelo menos 2 fases, uma inferior aquosa e uma superior oleosa. As emulsões mais estáveis foram obtidas em pH 3,5, condição em que o colágeno é capaz de exercer uma maior estabilização eletrostática, enquanto que em pH 9,2 as emulsões apresentaram-se muito instáveis, com aproximadamente 70 % (v/v) de índice de cremeação (Tabela 4.8).

As emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado a 50°C/20min e 50°C/60min apresentaram a maior estabilidade, principalmente em pH 3,5, com somente 10% v/v de separação, ao contrário das emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado a 65°C/60min, que apresentaram os maiores índices de cremeação. Como mostrado na Tabela 4.9, o tempo para se visualizar o início da separação de fases das emulsões em pH 3,5 foi altamente

dependente do tratamento térmico dado ao colágeno. As emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado a 50°C não apresentaram separação de fases por 2 dias, enquanto que as emulsões hidrolisadas a 65°C demoraram de 15 a 17,5 minutos para se separarem e o aumento da temperatura para 85°C retardou os mecanismos de desestabilização da emulsão por 3h. Vale lembrar que, como apresentado no item 4.1, a emulsão estabilizada por colágeno não hidrolisado não apresentou separação de fases em pH 3,5, enquanto que em pH ajustado para 7,5, a emulsão apresentou índice de cremação de 57,5 % (v/v) e se separou imediatamente após o preparo da emulsão, provavelmente em função do baixo teor de proteína solúvel.

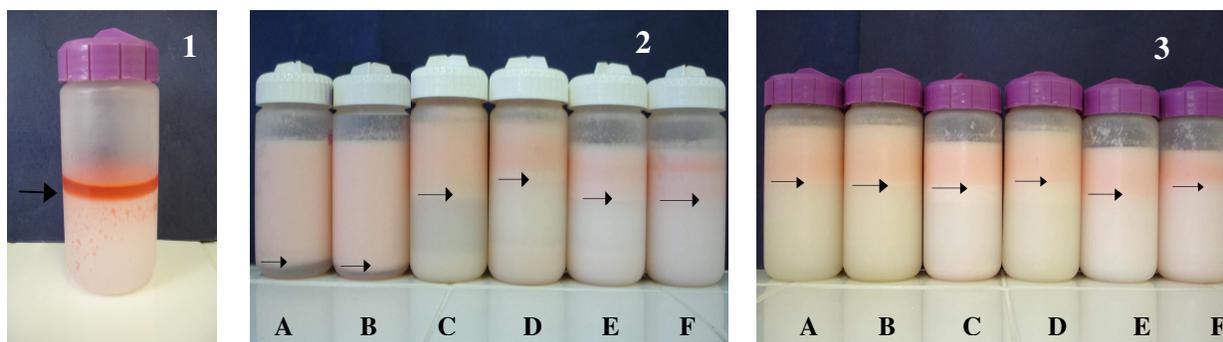


Figura 4.22. Aparência das emulsões sem adição de emulsificantes (1) e estabilizadas por 1%(m/m) de fibra parcialmente hidrolisada em pH 3,5 (2) e pH 9,2 (3). Tratamentos: (A) 50°C/20min, (B) 50°C/60min, (C) 65°C/20min, (D) 65°C/60min, (E) 85°C/20min e (F) 85°C/60min.

Tabela 4.9. Índice de cremação (%v/v) e tempo para início de visualização da separação de fases das emulsões estabilizadas por 1 % m/m de fibra de colágeno parcialmente hidrolisado.

Tratamentos	Índice de cremação (% v/v)		Tempo de início de separação	
	pH 3,5	pH 9,2	pH 3,5	pH 9,2
50/20	10,00	60,90	2 dias	22,5 min
50/60	10,00	59,90	2 dias	15,0 min
65/20	43,70	67,50	15,0 min	22,5 min
65/60	59,20	73,00	17,5 min	22,5 min
85/20	42,70	67,50	3 h	17,5 min
85/60	42,20	71,50	3 h	15,0 min

4.6.1.2. Composição química das fases

A Tabela 4.10 apresenta a composição química das fases separadas após 7 dias de estocagem das emulsões, momento em que elas se encontram em equilíbrio (índice de cremação constante). O processo de hidrólise da fibra de colágeno levou ao aumento da razão proteína/água na fase inferior, já que o conteúdo de proteína solúvel em água aumentou com a temperatura e o tempo de hidrólise do colágeno, como apresentado no item 4.4. Entretanto, não é possível associar a estabilidade das emulsões com a razão emulsificante/componente predominante na fase como concluído por Perrechil (2008), já que o aumento de proteína/água na fase inferior ocorreu em emulsões com maior índice de cremação, apesar da separação de fase em algumas destas emulsões terem ocorrido de forma mais lenta. Já na fase superior, a elevação da temperatura de hidrólise do colágeno de 50°C para 65°C ou 85°C provocou o aumento da razão óleo/água e a redução da razão proteína/óleo da fase superior, coerente com os testes de estabilidade, esclarecendo que a hidrólise reduziu a quantidade de proteína disponível e capaz de recobrir a superfície das gotas de óleo.

Desta forma, a hidrólise diminuiu as propriedades estabilizantes do colágeno. O perfil eletroforético das frações solúveis dos hidrolisados (Figura 4.17) é capaz de explicar as mudanças nas propriedades emulsificante do colágeno. Os hidrolisados a 50°C, ainda com boas propriedades emulsificantes, apresentaram em suas frações solúveis a fração β , conhecida por apresentar um conteúdo maior de aminoácidos hidrofóbicos do que a fração α , ainda presente em todos os hidrolisados (ASGHAR & HENRICKSON, 1982). Além disso, os hidrolisados a 65 °C e 85°C apresentaram agregados em suas frações solúvel ou insolúvel, diminuindo sua capacidade de interação com o óleo. O processo de hidrólise também reduziu a quantidade de proteína insolúvel responsável pelo impedimento molecular das gotas contra o processo de coalescência, além de reduzir o ponto isoelétrico do colágeno, diminuindo a capacidade de estabilização eletrostática do colágeno.

Tabela 4.10. Composição química das fases separadas após 7 dias de estocagem das emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado em pH 3,5 e pH 9,2.

pH	Tratamento	Fase inferior				Fase superior				
		% (m/m) proteína	% (m/m) óleo	% (m/m) água	10^3 * Razão proteína/água	% (m/m) proteína	% (m/m) óleo	% (m/m) água	Razão óleo/água	Razão proteína/óleo
3,5	50°C/20min	0,13 ± 0,01	0,97 ± 0,03	98,03 ± 2,19	1,37	3,21 ± 0,09	19,70 ± 0,77	76,66 ± 1,48	0,12	0,13
	50°C/60min	0,07 ± 0,00	0,16 ± 0,07	99,55 ± 0,03	0,68	3,32 ± 0,07	16,04 ± 0,05	82,47 ± 1,02	0,15	0,12
	65°C/20min	0,33 ± 0,02	0,27 ± 0,19	99,25 ± 0,11	3,28	2,59 ± 0,11	20,17 ± 0,34	79,50 ± 1,20	0,26	0,09
	65°C/60min	1,42 ± 0,05	1,05 ± 0,04	97,48 ± 0,10	14,52	1,94 ± 0,15	22,50 ± 0,06	76,51 ± 0,65	0,36	0,07
	85°C/20min	0,75 ± 0,06	0,41 ± 0,03	98,66 ± 0,11	7,61	2,56 ± 0,00	23,23 ± 1,06	74,79 ± 0,38	0,25	0,09
	85°C/60min	0,72 ± 0,03	0,37 ± 0,07	98,51 ± 0,27	7,30	2,72 ± 0,04	21,31 ± 0,28	76,33 ± 1,21	0,24	0,09
9,15	50°C/20min	0,04 ± 0,00	0,17 ± 0,02	99,73 ± 0,02	0,43	1,33 ± 0,02	10,26 ± 0,13	88,30 ± 0,11	0,26	0,16
	50°C/60min	0,03 ± 0,00	0,14 ± 0,10	99,49 ± 0,32	0,34	1,49 ± 0,00	12,56 ± 0,27	85,41 ± 0,15	0,19	0,21
	65°C/20min	0,09 ± 0,01	0,27 ± 0,12	99,41 ± 0,13	0,94	1,79 ± 0,00	20,21 ± 0,11	77,66 ± 1,87	0,25	0,13
	65°C/60min	0,23 ± 0,11	0,20 ± 0,04	99,55 ± 0,05	2,35	1,70 ± 0,02	25,69 ± 0,10	70,98 ± 0,17	0,29	0,09
	85°C/20min	0,18 ± 0,01	0,49 ± 0,13	99,21 ± 0,09	1,80	1,71 ± 0,01	19,25 ± 0,06	77,92 ± 0,39	0,31	0,11
	85°C/60min	0,22 ± 0,01	0,92 ± 0,04	98,70 ± 0,02	2,23	1,62 ± 0,01	18,63 ± 0,83	78,44 ± 0,37	0,28	0,13

4.6.1.3. Tamanho e distribuição de tamanho de gota

As imagens de microscopia ótica realizadas nas emulsões estão apresentadas na Figura 4.23. Em pH 9,2, observa-se a estrutura do colágeno intacta, separando e deformando algumas gotas. Entretanto, não foi observada uma estrutura de emulsão verdadeira, com gotas de óleo dispersas em um meio aquoso, impossibilitando o cálculo dos valores médio de diâmetro de gotas e a sua distribuição de tamanho. Já em pH 3,5, as emulsões eram formadas por gotas polidispersas, com diâmetro (d_{32}) variando de 9,09 a 13,75 μm (Tabela 4.11). A mediana dos diâmetros não apresentaram diferença significativa (Tabela 4.10), enquanto que o diâmetro médio (d_{32}) aumentou gradativamente com a hidrólise, apresentando diferenças significativas entre os tratamentos extremos, com exceção da emulsão estabilizada por colágeno hidrolisado a 65°C/60min que apresentou o maior diâmetro médio (d_{32}), conforme resultados observados no índice de cremeação e composição das fases.

Tabela 4.11. Diâmetro de gota d_{32} (μm) das emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado em pH 3,5.

Tratamentos	d_{32} (μm)	Mediana (μm)
não hidrolisado	8,60 \pm 1,65 ^a	3,25 \pm 0,33 ^a
50°C/20min	9,09 \pm 1,36 ^a	3,26 \pm 0,39 ^a
50°C/60min	10,44 \pm 1,43 ^{ab}	2,90 \pm 0,28 ^a
65°C/20min	9,52 \pm 0,88 ^{ab}	2,98 \pm 0,18 ^a
65°C/60min	13,75 \pm 2,89 ^c	2,97 \pm 0,38 ^a
85°C/20min	11,49 \pm 1,82 ^{ab}	3,09 \pm 0,30 ^a
85°C/60min	11,73 \pm 1,55 ^b	3,24 \pm 0,70 ^a

Diferentes letras significam diferença significativa entre valores da mesma coluna ($p > 0,05$).

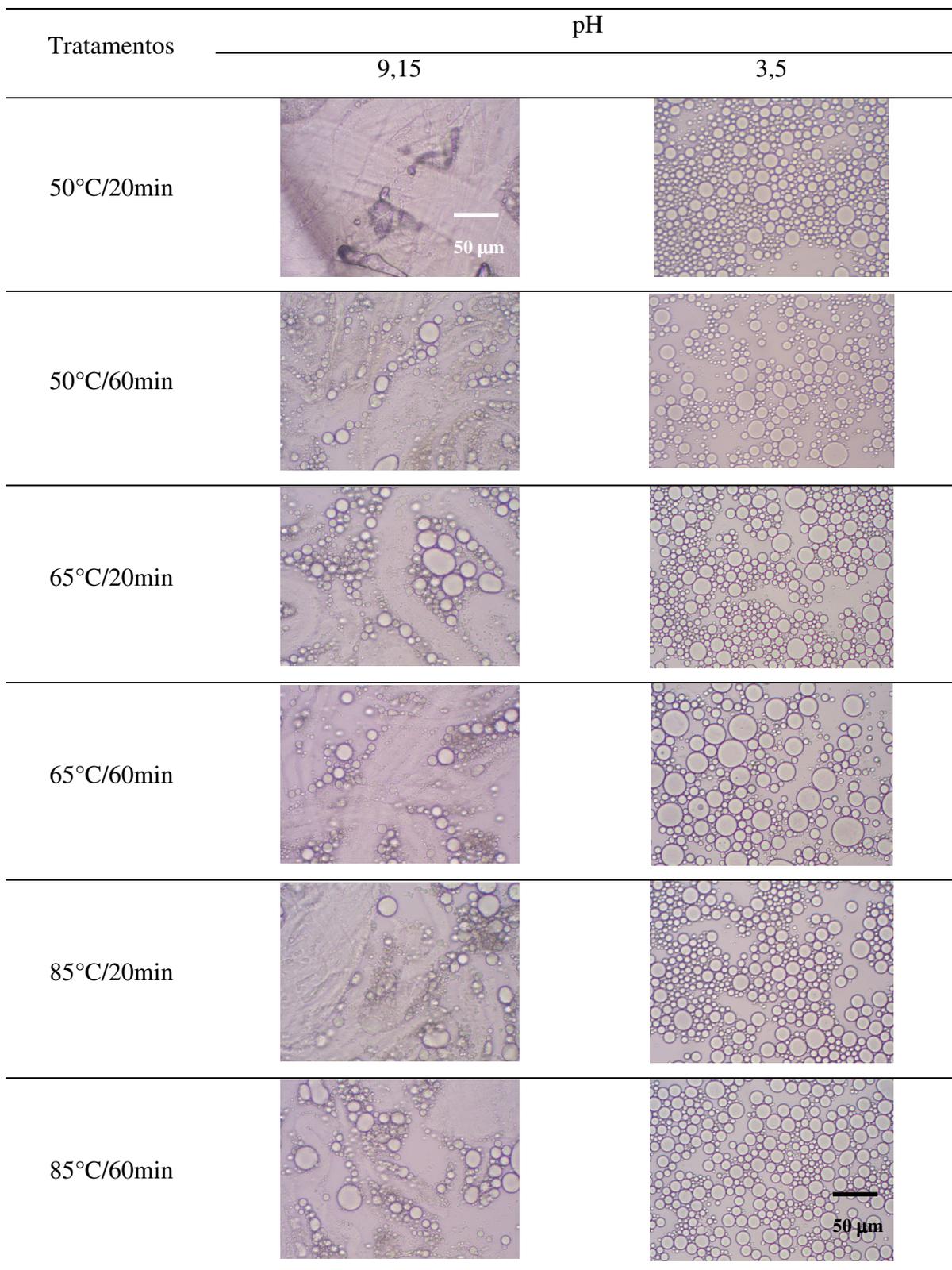


Figura 4.23. Microscopias das emulsões O/A estabilizadas por 1% (m/m) de proteína de fibra de colágeno parcialmente hidrolisada em pH 3,5 e 9,2. Barra de escala = 50μm

A distribuição do tamanho de gotas apresentado na Figura 4.24 mostra a polidispersão das gotas das emulsões em pH 3,5. As emulsões apresentaram uma frequência elevada de gotas com diâmetro entre 1 e 5 μm , sendo que o aumento da temperatura e do tempo de hidrólise elevou a frequência de gotas com diâmetro maior que 10 μm . Já a emulsão estabilizada por colágeno hidrolisado a 65°C/60min possui uma quantidade significativa de gotas com diâmetro maior que 20 μm , explicando seu elevado diâmetro médio e instabilidade.

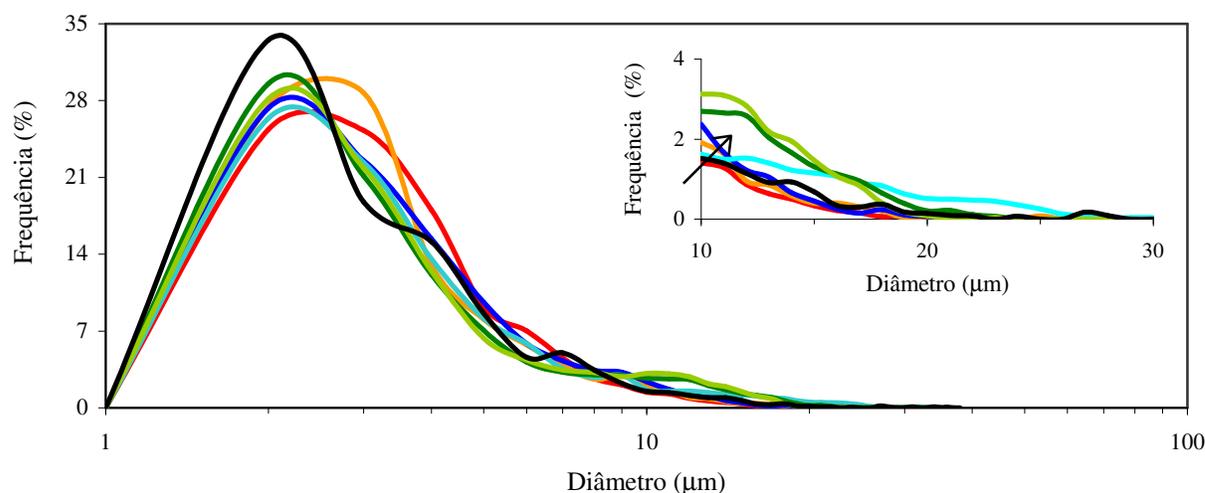


Figura 4.24. Distribuição do diâmetro de gota em emulsões estabilizadas por colágeno em pH 3,5 (no detalhe o comportamento da distribuição de gota com diâmetro maior que 10 μm). Tratamentos: (—) não hidrolisado, (—) 50°C/20min, (—) 50°C/60min, (—) 65°C/20min, (—) 65°C/60min, (—), 85°C/20min, (—) 85°C/60min.

4.6.2. Efeito do conteúdo de fração solúvel de colágeno hidrolisado

Foi realizada uma avaliação preliminar sobre o efeito emulsificante/estabilizante da fibra de colágeno parcialmente hidrolisado em pH 9,2, quando utilizada em diferentes proporções de proteína solúvel e insolúvel. Para isso, a fibra de colágeno parcialmente hidrolisado teve suas frações solúvel e insolúvel separadas por centrifugação, sendo em

seguida preparadas dispersões contendo 1% (m/m) de proteína total, composta por diferentes proporções de proteína solúvel e insolúvel.

4.6.2.1 Estabilidade

O aspecto visual das emulsões está apresentado na Figura 4.25, observando-se a existência de três fases, a superior rosada (oleosa), a intermediária esbranquiçada (aquosa) e a inferior transparente (aquosa), sendo que a fase denominada como intermediária aumentou com o teor de proteína solúvel. Além disso, as emulsões com elevado teor de proteína solúvel, maior que 80% (m/m), gelificaram.

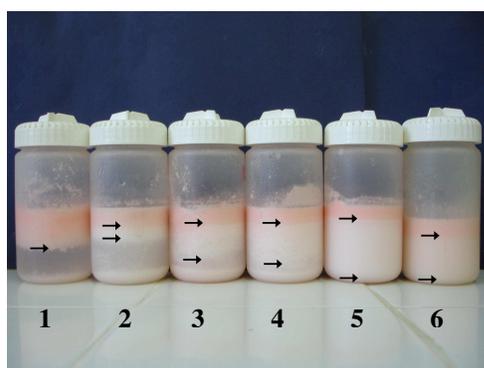


Figura 4.25. Emulsões estabilizadas por diferentes frações de proteína solúvel de colágeno parcialmente hidrolisado. Fração de proteína solúvel (1) 0%, (2) 20%, (3) 40%, (4) 60%, (5) 80% e (6) 100%.

De modo geral, a hidrólise da fibra diminuiu a estabilidade das emulsões (Figura 4.26), sendo que as emulsões estabilizadas pelo colágeno hidrolisado a 50°C/60min apresentaram os menores índices de cremação, seguida por aquelas estabilizadas por colágeno hidrolisado a 65°C/20min, 50°C/20min, 65°C/60min, 85°C/20min e finalmente, 85°C/60min. O tempo mínimo para a visualização da separação de fases em função do teor de proteínas solúveis está representado na Figura 4.27, observando que o incremento de 20

a 40 % (m/m) de proteína solúvel retarda os processos de desestabilização das emulsões compostas pelos hidrolisados a 85°C, aumentando o tempo para o início da separação de fases. Entretanto, o tempo de separação de fases se mantém constante com a adição de níveis superiores de proteína solúvel, ficando em torno de 2h nas emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado a 85°C e de 15 a 40 min nas demais emulsões.

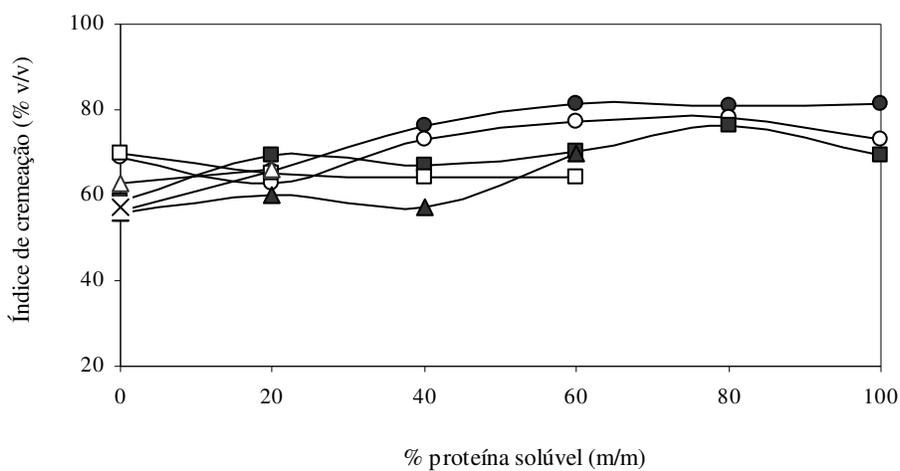


Figura 4.26. Índices de cremeação obtidos em emulsões estabilizadas por 1% (m/m) de fibra de colágeno em diferentes frações de proteína solúvel. Tratamentos: Não hidrolisada (x), 50°C/20min (Δ), 50°C/60min (▲), 65°C/20min (□), 65°C/60min (■), 85°C/20min (○) e 85°C/60min (●).

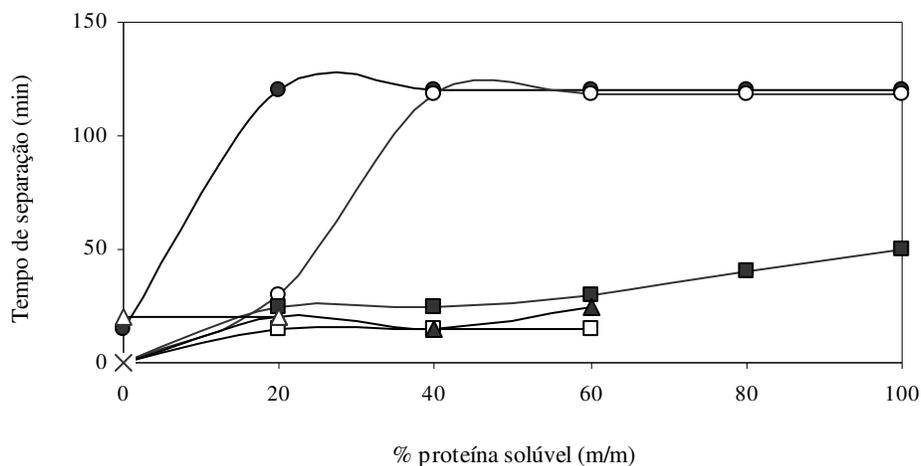


Figura 4.27. Tempo mínimo para início da visualização da separação de fases em emulsões estabilizadas por 1% (m/m) de fibra de colágeno em diferentes frações de proteína solúvel. Tratamentos: não hidrolisada (x), 50°C/20min (Δ), 50°C/60min (▲), 65°C/20min (□), 65°C/60min (■), 85°C/20min (o) e 85°C/60min (●).

Em geral, o processo de hidrólise e o incremento de proteína solúvel não aumentaram a estabilidade das emulsões, provavelmente em função da baixa atividade interfacial das moléculas de menor massa molar produzidas pelo processo de hidrólise. A caracterização das propriedades emulsificantes em função da distribuição de massa molar também foi discutida por Li et al (2009), onde as propriedades emulsificantes de hidrolisado de colágeno proveniente de pele suína, contendo moléculas 60 kDa, foram melhores que as de hidrolisado proveniente de osso bovino, contendo moléculas menores que 43 kDa.

4.7. Micro-emulsões

O efeito da pressão de homogeneização (200, 600 e 1000 bar) e da hidrólise térmica do colágeno (50 a 85°C, por 20 a 60 min) foi avaliada em emulsões compostas por 10% (m/m) de óleo e 0,5 % (m/m) de fibra de colágeno parcialmente hidrolisada em pH 3,5, condição em que o colágeno apresentou melhores propriedades estabilizantes.

4.7.1. Índice de cremeação

Entre os diferentes tratamentos, todas as emulsões homogeneizadas a 200 bar apresentaram separação de fases após sete dias de estocagem (Figura 4.28). O índice de cremeação foi de aproximadamente 10% (v/v) em relação ao volume total, apresentando aspecto heterogêneo, com fibras de colágeno visivelmente insolúveis. Já as emulsões homogeneizadas a 600 e 1000 bar não separaram de fases e apresentaram aspecto mais homogêneo.

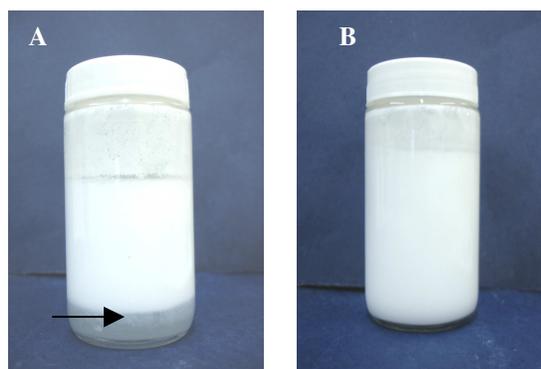


Figura 4.28. Separação de fases das emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado a 65°C/20min. Pressão de homogeneização: A) 200 bar e B) 600 bar.

4.7.2. Diâmetro e distribuição do tamanho de gotas

As microscopias das emulsões estão apresentadas na Figura 4.29, observando-se uma grande redução do tamanho das gotas quando a pressão de homogeneização aumentou de 200 para 600 bar. Entretanto, tornou-se difícil a diferenciação visual entre as imagens das emulsões homogeneizadas a 600 e 1000 bar, pois elas apresentaram gotas de tamanho muito reduzido, com estrutura bastante similar, sem indícios de floculação.

Os valores de diâmetro médio (d_{32}) calculados a partir da análise de imagens e apresentados na Tabela 4.12 encontram-se na faixa de 0,98 a 5,13 μm , cerca de seis vezes inferiores àqueles observados nas macro-emulsões estabilizadas por fibra de colágeno não hidrolisada (Tabela 4.3). Entretanto, Dickinson et al. (1997) e Perrechil (2008) chegaram a observar gotas com diâmetro médio superficial menor que 0,5 μm em emulsões estabilizadas por caseinato de sódio e homogeneizadas a alta pressão, valor bastante inferior ao encontrado neste trabalho.

A pressão apresentou grande efeito no tamanho das gotas, ocorrendo uma redução estatisticamente significativa d_{32} com o aumento da pressão de 200 para 600 bar, porém nenhuma diferença significativa foi observada nos valores de diâmetro de gota das emulsões homogeneizadas a 600 e 1000 bar. O efeito da hidrólise parcial do colágeno não foi visivelmente perceptível pelas imagens, entretanto, o cálculo de d_{32} mostrou uma redução significativa do tamanho de gota com o aumento da temperatura de hidrólise em emulsões homogeneizadas a 200 e 600 bar, com exceção da emulsão estabilizada por 65°C/60min que apresentou um valor elevado de d_{32} na emulsão homogeneizada a 200 bar, como já observado nas macro-emulsões emulsificadas em Ultra-Turrax.. As medianas diminuíram com a hidrólise nas emulsões homogeneizadas a 200 bar, não sendo observado

nenhum comportamento discrepante na emulsão estabilizada por colágeno hidrolisado a 65°C/60min.

Tabela 4.12. Diâmetro médio de gota (d_{32}) e mediana do diâmetro em função da pressão de homogeneização e da hidrólise parcial do colágeno

Tratamentos	200 bar		600 bar		1000 bar	
	d_{32}	Mediana	d_{32}	Mediana	d_{32}	Mediana
	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)
Não-hidrolisado	5,13 ^{aA}	2,44 ^{abA}	1,40 ^{aB}	0,90 ^{aB}	1,18 ^{abB}	0,80 ^{aB}
50°C/20min	4,11 ^{abA}	3,17 ^{aA}	1,34 ^{abB}	0,94 ^{aB}	1,39 ^{aB}	0,82 ^{aB}
50°C/60min	3,94 ^{abA}	2,41 ^{abA}	1,12 ^{bcB}	0,77 ^{aB}	1,09 ^{abB}	0,87 ^{aB}
65°C/20min	3,34 ^{bcA}	2,39 ^{abA}	1,17 ^{abcB}	0,82 ^{aB}	1,08 ^{abB}	0,75 ^{aB}
65°C/60min	4,79 ^{aA}	2,75 ^{abA}	1,11 ^{bcB}	0,74 ^{aB}	0,98 ^{bB}	0,80 ^{aB}
85°C/20min	2,98 ^{bcA}	1,87 ^{bcA}	1,06 ^{cb}	0,76 ^{aB}	1,12 ^{abB}	0,81 ^{aB}
85°C/60min	2,53 ^{cA}	1,18 ^{cA}	1,07 ^{cb}	0,82 ^{aB}	1,20 ^{abB}	0,85 ^{aB}

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras maiúsculas: diferenças dentro da mesma linha. Letras minúsculas: diferenças dentro da mesma coluna.

A Figura 4.30 mostra a distribuição do tamanho de gotas das emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado. Observa-se que as emulsões homogeneizadas a 200 bar possuem uma polidispersão acentuada, sendo que aquelas estabilizadas por colágeno não hidrolisado e hidrolisado a 50°C apresentam uma distribuição bimodal, enquanto que aquelas estabilizadas por colágeno mais hidrolisado possui uma frequência maior de gotas de diâmetro menor. Este comportamento foi contrário ao observado nas macro-emulsões (Figura 4.24), sugerindo um efeito secundário do processo de homogeneização a alta pressão nas propriedades emulsificantes do colágeno, como a abertura da fibra de colágeno e a exposição de grupos hidrofóbicos. Já as emulsões homogeneizadas a 600 e 1000 bar são menos polidispersas, sendo que a maioria das gotas possui diâmetro menor que 1 μm .

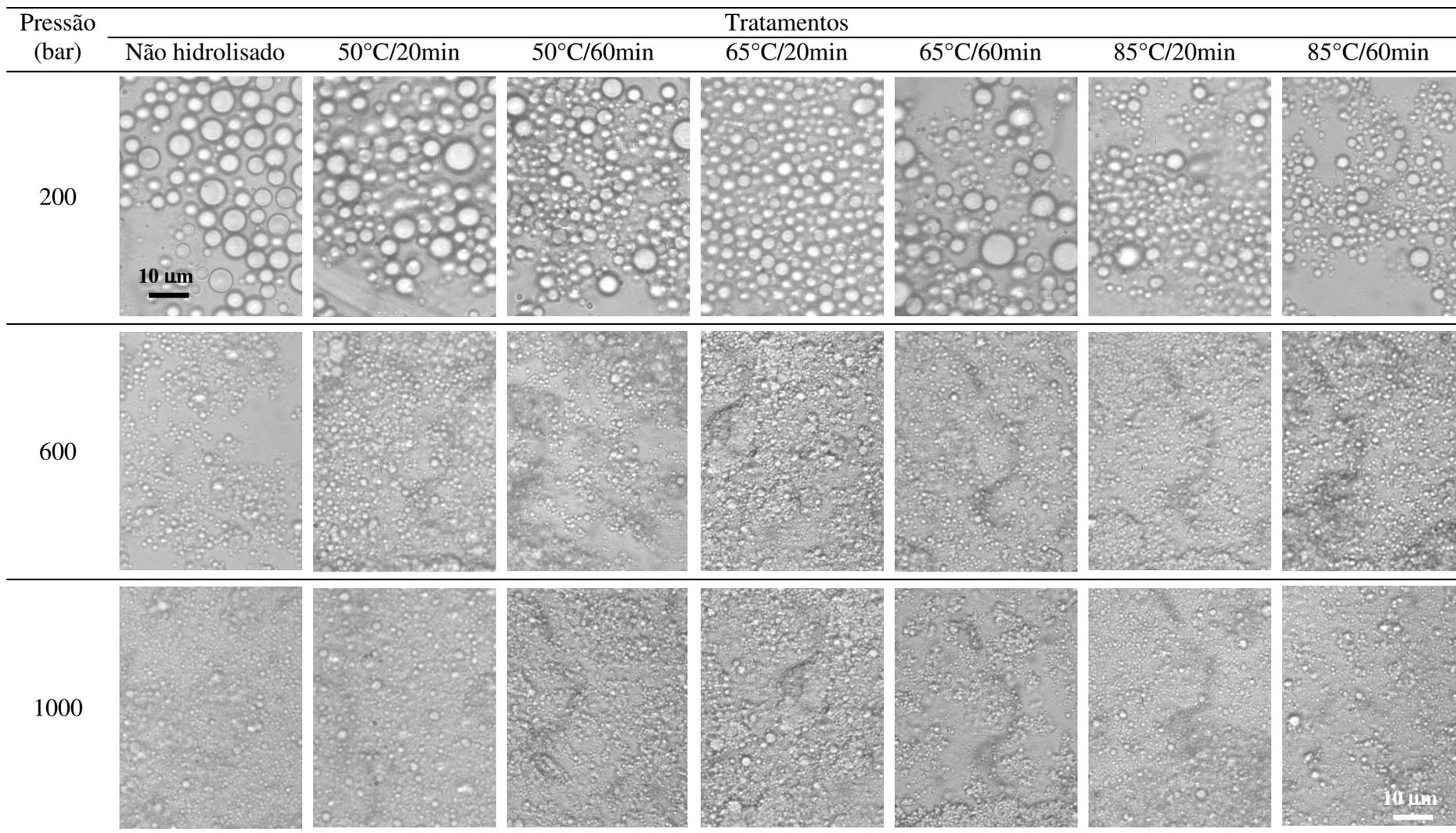


Figura 4.29. Micrografia das emulsões O/A compostas por 0,5 % (m/m) de fibra de colágeno não hidrolisada e parcialmente hidrolisada. Barra da escala = 10 μm .

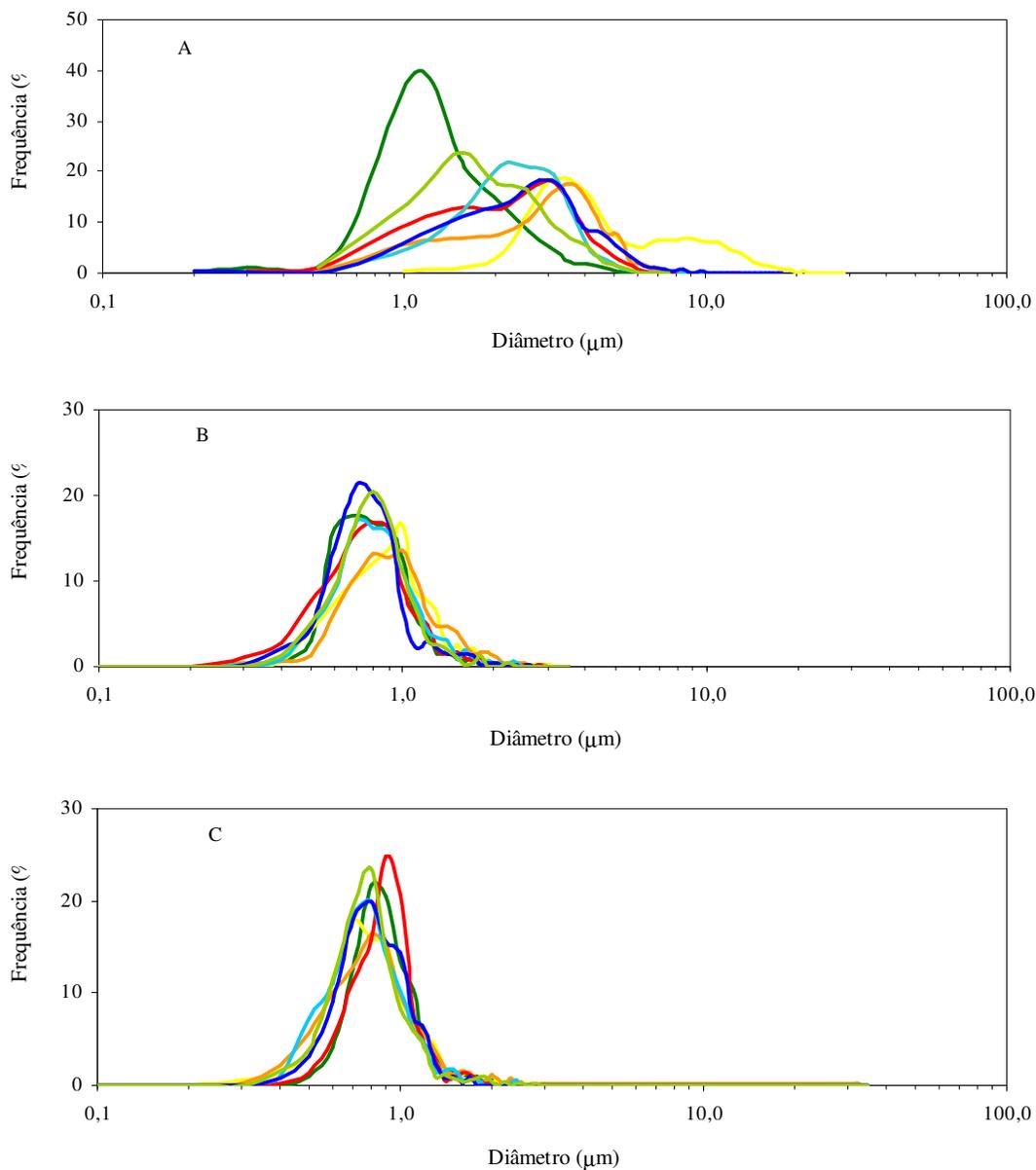


Figura 4.30. Distribuição do diâmetro de gota em emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado. Tratamentos: () colágeno não hidrolisado, () 50°C/20min, () 50°C/60min, () 65°C/20min, () 65°C/60min, () 85°C/20min, () 85°C/60min. Pressão de homogeneização: (A) 200 bar, (B) 600 bar e (C) 1000 bar.

Na Figura 4.31 estão apresentados os valores da constante m obtida a partir da proporcionalidade empírica do tipo lei da potência descrita por $d_{32} \propto P^m$, onde P é a pressão de homogeneização (bar) e d_{32} o diâmetro médio superficial (μm). A constante

m está associada ao escoamento do fluido no homogeneizador, caracterizado pelo número de Reynolds (Re), que depende das dimensões da válvula de homogeneização, da viscosidade do fluido e da pressão de homogeneização (FLOURY, et al., 2003). Com exceção da emulsão estabilizada por colágeno parcialmente hidrolisado a 65°C/60min, a constante m tendeu a diminuir com o processo de hidrólise dado ao colágeno, variando de 0,96 a 0,51. Esta variação indica que o fluido tendeu a apresentar um escoamento mais turbulento dentro do homogeneizador à medida que se hidrolisou o colágeno, já que valores elevados do expoente m são associados a escoamento laminar e valores menores são associados a escoamento turbulento (FLOURY, et al., 2003). A redução da viscosidade das emulsões com o aumento do processo de hidrólise (Figuras 4.32 e 4.32) aumentou o número de Reynolds, levando o escoamento a um comportamento mais turbulento.

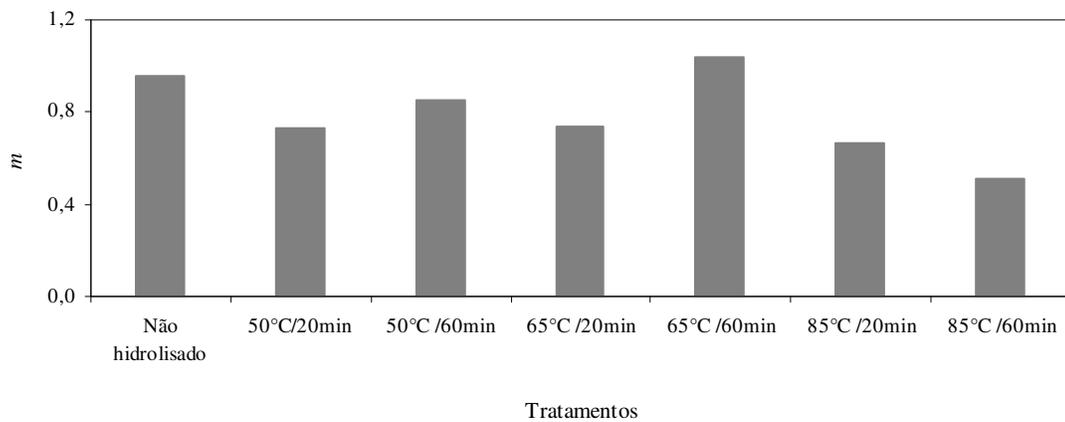


Figura 4.31. Evolução da constante m com o processo de hidrólise.

4.7.3. Reologia

As curvas de escoamento em estado estacionário estão ilustradas na Figura 4.32, observando-se que as emulsões apresentaram um comportamento de fluido pseudoplástico, mas tenderam a um comportamento newtoniano com o aumento do processo de hidrólise do colágeno e da pressão de homogeneização. Além disso, o

aumento da pressão de homogeneização e da intensidade do tratamento térmico levaram a um decréscimo da tensão de cisalhamento.

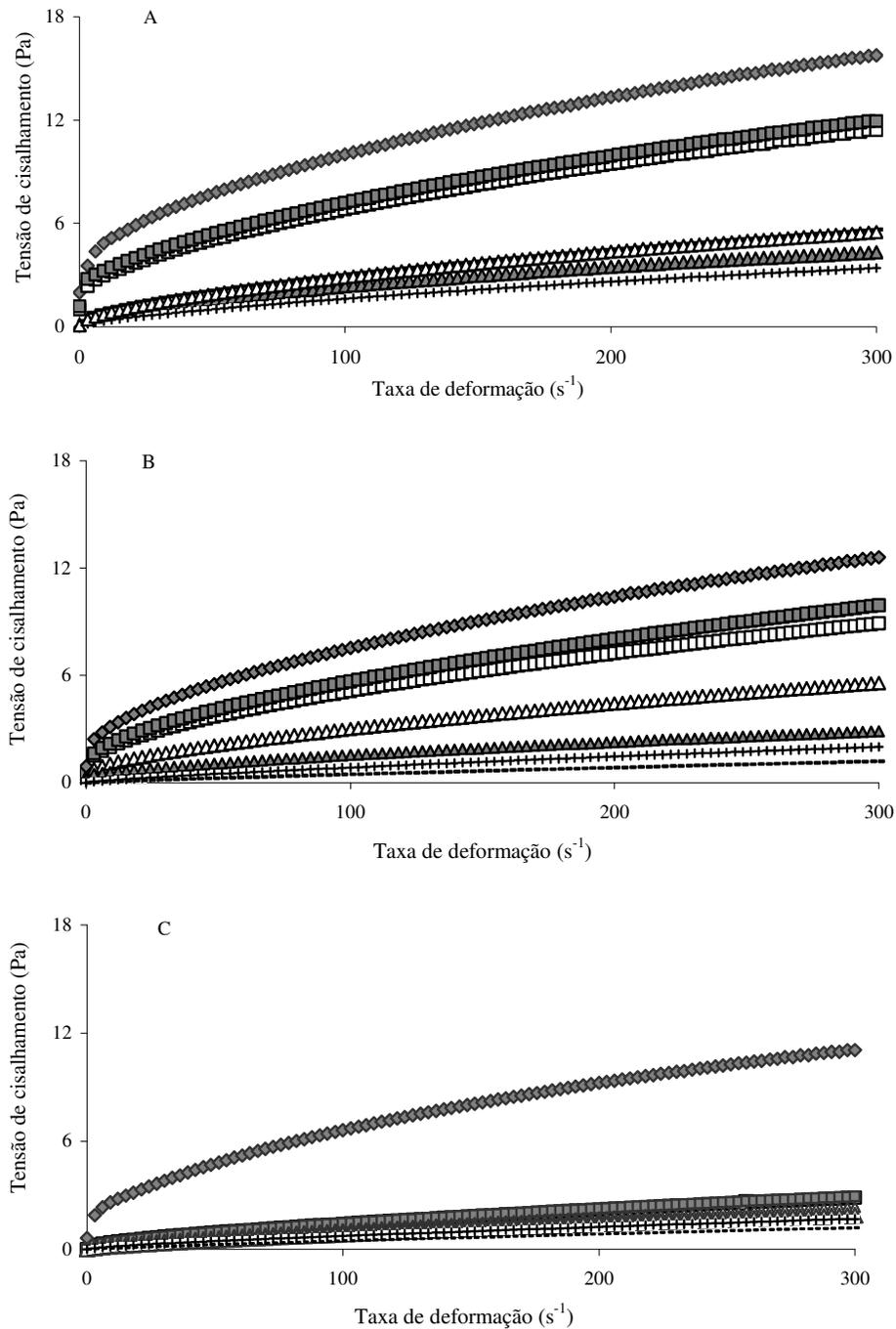


Figura 4.32. Curvas de escoamento das emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado. Tratamentos: (◆) não hidrolisado, (□) 50°C/20min, (■) 50°C/60min, (Δ) 65°C/20min, (▲) 65°C/60min, (+) 85°C/20min, (-) 85°C/60min. Pressão de homogeneização: (A) 200 bar, (B) 600bar e (C) 1000 bar.

O aumento da pressão de homogeneização reduziu a viscosidade aparente a 100 s^{-1} até um valor limite (Figura 4.33), como observado por Flourey et al (2000) e Flourey et al (2003) em emulsões estabilizadas por proteínas de soro e metil-celulose, respectivamente. O baixo diâmetro de gota encontrado nestas emulsões podem ter resultado em uma menor interação entre as gotas, levando à diminuição da viscosidade dos sistemas. Entretanto, observa-se que esta redução foi maior de 600 para 1000 bar, condições em que os tamanhos das gotas foram semelhantes, indicando não ser este o único fator que influenciou nas propriedades reológicas das emulsões estabilizadas por colágeno. Da mesma maneira, foi observado que o aumento da hidrólise também provocou a redução da viscosidade, mostrando que as propriedades reológicas das emulsões também dependem das propriedades emulsificantes/estabilizantes do colágeno.

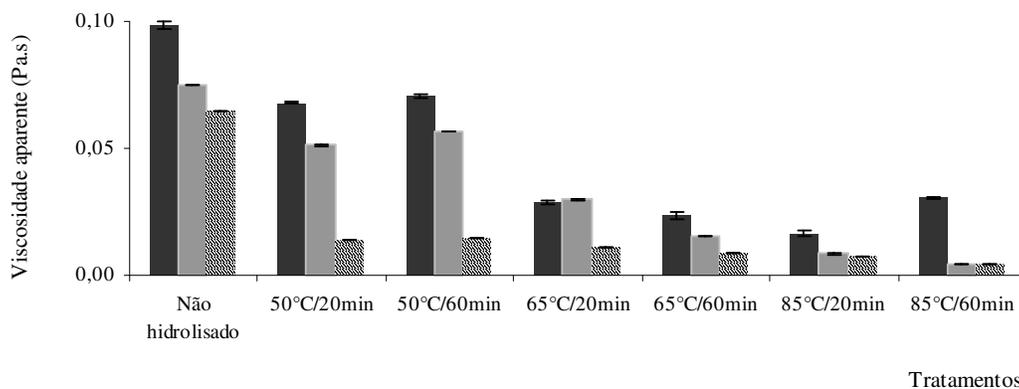


Figura 4.33. Viscosidade aparente a 100 s^{-1} das emulsões estabilizadas por 0,5% (m/m) de colágeno parcialmente hidrolisado. Pressão de homogeneização: (■) 200 bar, (■) 600 bar, (▨) 1000 bar.

Já que algumas emulsões apresentaram tensão residual (σ_0), o modelo Herschel-Bulkley (HB) foi ajustado às curvas de escoamento, apresentando coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,999 em todos os sistemas estudados, sendo os parâmetros apresentados na Figura 4.34. Da mesma forma como ocorreu com a viscosidade aparente, o aumento da pressão de homogeneização e do processo de

hidrólise provocou a redução do índice de consistência (k) e da tensão residual (σ_0), além do aumento do índice de comportamento, reduzindo a pseudoplasticidade das emulsões. Este comportamento é explicado pela estrutura das emulsões, que passaram a apresentar menores diâmetros de gota com o aumento da pressão e da hidrólise, além do efeito de ambas variáveis nas propriedades do ingrediente emulsificante colagenoso.

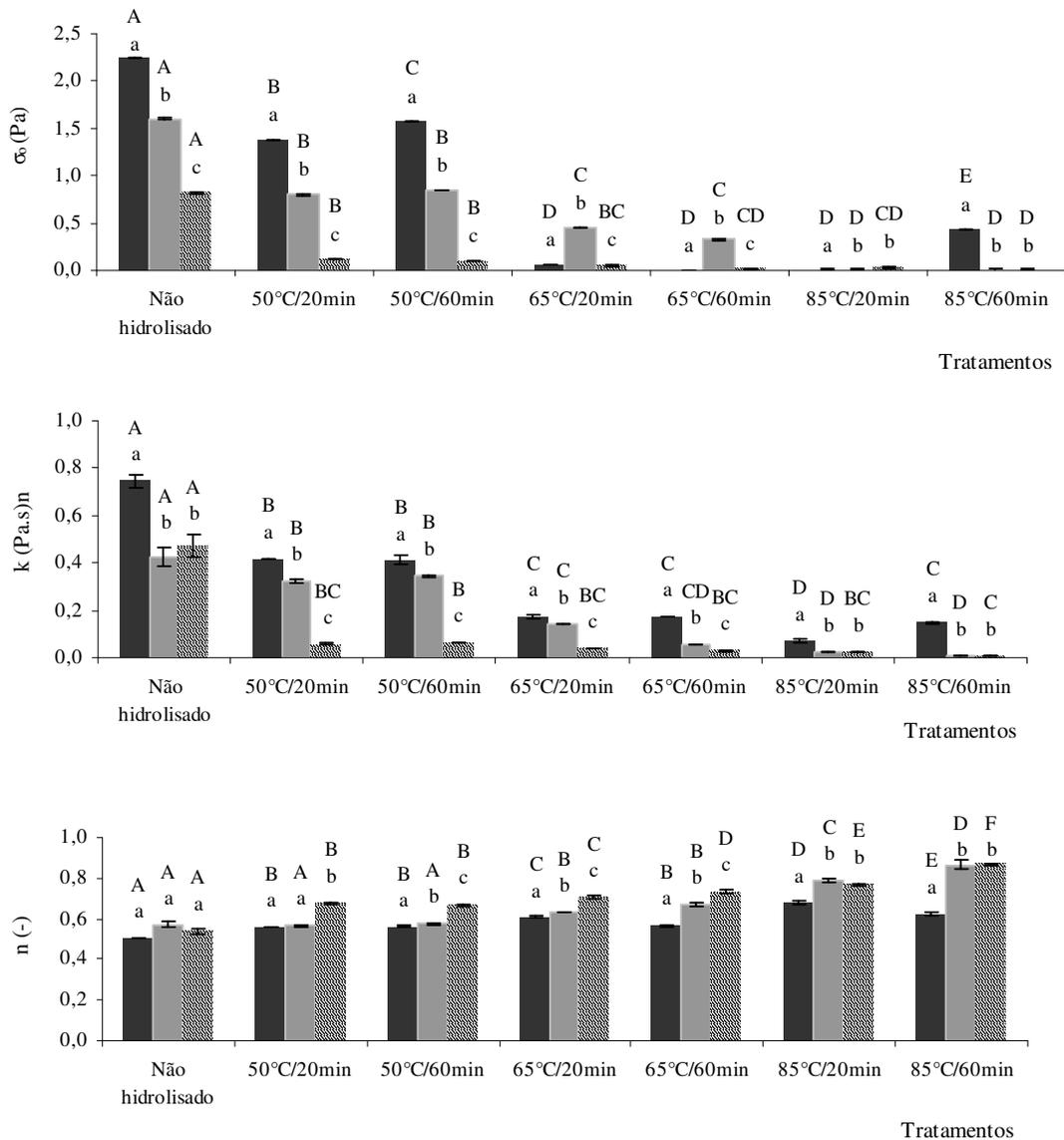


Figura 4.34. Parâmetros ajustado pelo modelo Herschel-Bulkley. ■: 200 bar, ■: 600 bar, ▨: 1000 bar. Diferentes letras minúsculas e maiúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$) em cada tratamento térmico e pressão de homogeneização, respectivamente.

As propriedades viscoelásticas das emulsões estão apresentadas na Figura 4.35, observando-se que o módulo complexo (G^*) diminuiu com o aumento da pressão de homogeneização e da hidrólise de colágeno. Isso refletiu no fato de que não foi possível realizar medidas reológicas dinâmicas nas emulsões homogeneizadas a 600 e 1000 bar e estabilizadas por colágeno hidrolisado a 65°C/60min, 85°C/20min e 85°C/60min, já que estas apresentaram propriedades elásticas e viscosas muito pequenas, dentro de uma faixa de valores incompatível com a sensibilidade do reômetro.

Os efeitos da pressão de homogeneização e da hidrólise térmica nas propriedades viscoelásticas das emulsões podem ser melhor visualizadas nas Tabelas 4.13 e 4.14. Os valores de G' e G'' foram obtidos em uma condição fixa de frequência, 1 Hz, enquanto que a dependência de G' e G'' em relação à frequência (ω) foi analisada a partir do ajuste de uma equação do tipo lei da potência aos dados de G' e G'' (G' ou $G'' \propto \omega^n$).

Os módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') diminuíram com o aumento da pressão de homogeneização e hidrólise do colágeno, exceto a emulsão estabilizada por colágeno hidrolisado a 65°C/60min. Esta emulsão apresentou o maior tamanho de gota (Figura 4.30) e a coalescência (floculação) das gotas podem estar refletindo em um aumento da viscoelasticidade dos sistemas. Apesar de ter sido encontrado uma mesma faixa de diâmetro de gotas nas emulsões homogeneizadas a 600 e 1000 bar, as emulsões homogeneizadas a 1000 bar apresentaram valores de G' e G'' menores e mais dependente da frequência, o que significa que a fibra e talvez as gotas apresentaram um maior rompimento com o aumento da pressão, formando emulsões menos estruturadas. Além disso, as emulsões estabilizadas por colágeno mais hidrolisado apresentaram G' e G'' mais dependentes da frequência, já que o conteúdo de proteína insolúvel diminuiu e as emulsões também tornaram-se menos estruturadas.

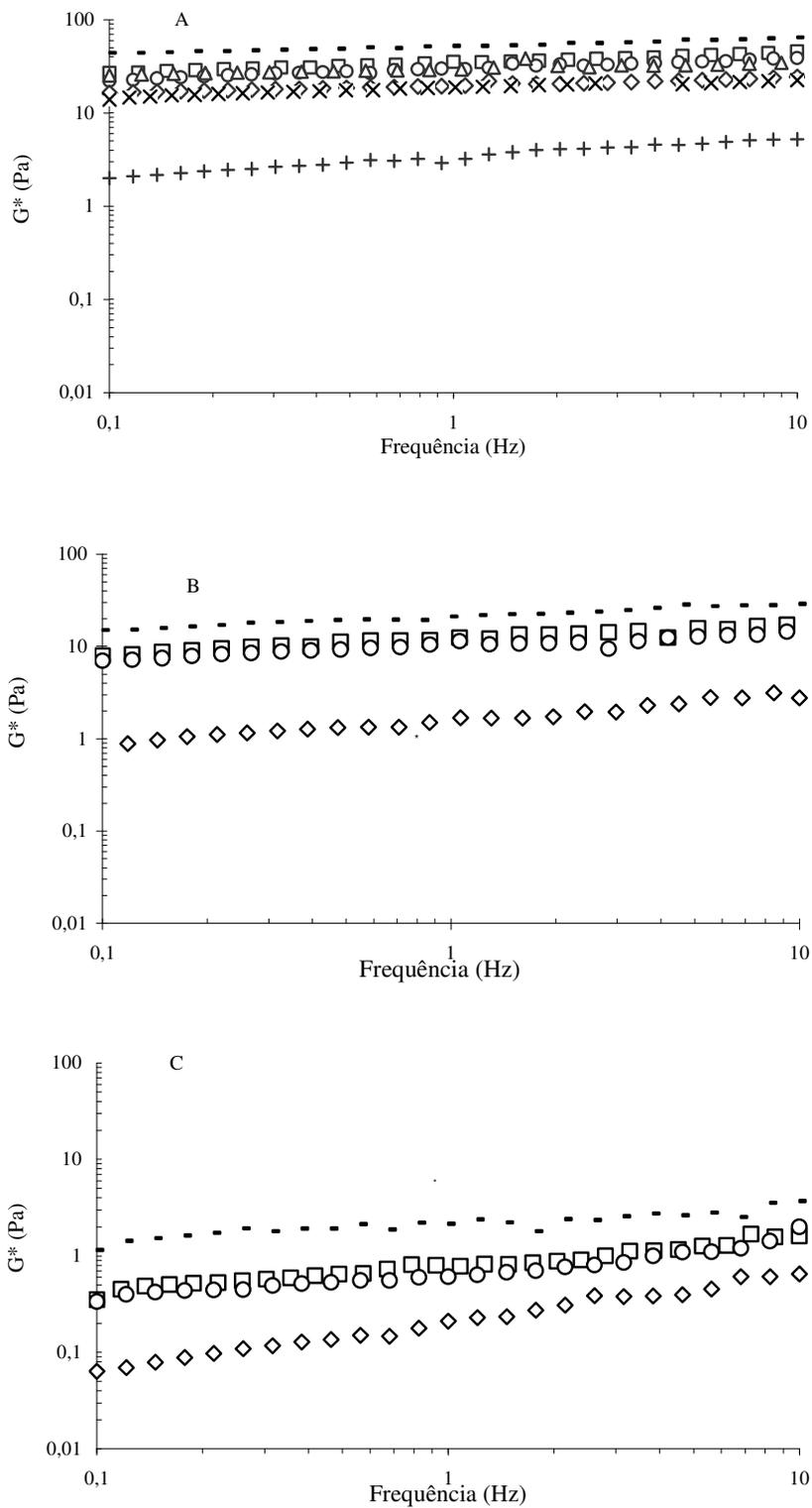


Figura 4.35. Módulo complexo. Tratamentos: (-) não hidrolisado, (\square) 50°C/20min, (o) 50°C/60min, (\diamond) 65°C/20min, (Δ) 65°C/60min, (\times) 85°C/20min, (+) 85°C/60min. Pressão de homogeneização: (A) 200 bar, (B) 600bar e (C) 1000 bar.

Tabela 4.13. Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em frequência fixa de 1 Hz de emulsões estabilizadas por 0,5% (m/m) de colágeno parcialmente hidrolisado.

Tratamentos	Pressão					
	200 bar		600 bar		1000 bar	
	G'	G''	G'	G''	G'	G''
Não hidrolisado	51,17 ^{aA}	5,83 ^{aA}	20,89 ^{aB}	2,54 ^{aB}	2,15 ^{aC}	0,53 ^{aC}
50°C/20min	35,15 ^{bA}	4,79 ^{bA}	12,33 ^{bB}	1,75 ^{bB}	0,71 ^{bC}	0,32 ^{bC}
50°C /60min	29,49 ^{bA}	3,86 ^{bA}	9,47 ^{bB}	0,56 ^{cB}	0,61 ^{bC}	0,26 ^{bB}
65°C /20min	19,57 ^{cA}	2,16 ^{cA}	1,38 ^{cB}	0,57 ^{cB}	0,12 ^{cC}	0,17 ^{cC}
65°C /60min	29,07 ^b	2,60 ^c	-	-	-	-
85°C /20min	16,26 ^c	1,88 ^c	-	-	-	-
85°C /60min	3,16 ^d	0,58 ^d	-	-	-	-

Diferentes letras significam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras minúsculas comparam valores dentro da mesma coluna, e letras maiúsculas comparam valores de G' ou G'' , separadamente, dentro da mesma linha da tabela.

Tabela 4.14. Constante n obtida pelo ajuste da lei da frequência aos dados de G' e G'' em função da frequência, em emulsões estabilizadas por 0,5% (m/m) de colágeno parcialmente hidrolisado.

Tratamentos	Pressão					
	200 bar		600 bar		1000 bar	
	n, G'	n, G''	n, G'	n, G''	n, G'	n, G''
Não hidrolisado	0,08 ^{aA}	0,20 ^{aA}	0,14 ^{aB}	0,22 ^{aA}	0,17 ^{aC}	0,29 ^{aB}
50°C/20min	0,11 ^{aA}	0,23 ^{aA}	0,16 ^{aA}	0,21 ^{aA}	0,26 ^{bB}	0,38 ^{bB}
50°C /60min	0,11 ^{aA}	0,23 ^{aA}	0,14 ^{aA}	0,23 ^{aA}	0,27 ^{bB}	0,40 ^{bB}
65°C /20min	0,08 ^{aA}	0,31 ^{bA}	0,24 ^{bA}	0,36 ^{bA}	0,47 ^{cB}	0,55 ^{cB}
65°C /60min	0,06 ^a	0,24 ^a	-	-	-	-
85°C /20min	0,08 ^a	0,34 ^b	-	-	-	-
85°C /60min	0,20 ^b	0,40 ^c	-	-	-	-

Diferentes letras significam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras minúsculas comparam valores dentro da mesma coluna, e letras maiúsculas comparam valores de G' ou G'' , separadamente, dentro da mesma linha.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram avaliar as propriedades emulsificantes do colágeno em condições de pH neutro e ácido, esclarecendo alguns mecanismos de interação desta proteína e os fatores que interferem na estabilidade, microestrutura e reologia das emulsões. Como o ponto isoelétrico do colágeno está em torno de 8,8, bem maior do que da maior parte das proteínas globulares, foi viável a produção de emulsões estáveis em pH 3,5.

Dentre os ingredientes avaliados, a fibra de colágeno não hidrolisada apresentou melhores propriedades estabilizantes/emulsificantes, sendo necessária uma menor quantidade de proteína para as emulsões apresentarem estabilidade equivalente àquelas compostas por pó de colágeno e fibra de colágeno parcialmente hidrolisada. A estabilidade das emulsões foi viabilizada por mecanismos de estabilização estérica pelas fibras insolúveis do colágeno e pela repulsão eletrostática entre as gotas em pH ácido.

A hidrólise térmica aumentou a solubilidade do colágeno e produziu moléculas de menor massa molar, principalmente nos processos que alcançaram temperaturas de 65°C e 85°C, diminuindo o ponto isoelétrico desta proteína. As macro-emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado mostraram-se instáveis, sendo que parte da proteína solúvel resultante do processo de hidrólise se deslocou para a fase aquosa, indicando que o processo de hidrólise diminuiu a capacidade da proteína de se ligar ao óleo. O processo de homogeneização a altas pressões reduziu significativamente o tamanho e a polidispersão das gotas das emulsões, produzindo fluidos de comportamento pseudoplástico, mais estáveis, porém menos estruturados. O comportamento pseudoplástico, o índice de consistência, a tensão residual e os módulos de armazenamento (G'), dissipação (G'') e complexo (G^*) das micro-emulsões estabilizadas por colágeno parcialmente hidrolisado diminuíram com o aumento da hidrólise do colágeno e da pressão de homogeneização.

De maneira geral, foi possível a produção de emulsões de estruturas diferenciadas a partir do colágeno não hidrolisado e parcialmente hidrolisado, porém a aplicação de elevadas pressões foi fundamental para a redução do tamanho de gota e, conseqüentemente, a maior estabilidade destas emulsões acidificadas e de baixa viscosidade.

CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, T. S., FERREIRA P. S. H. (2002). Propriedades funcionais de material colagenoso de pés de frango. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 52, 289-293.
- ANTON, N., BENOIT, J., SAULNIER, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, 128, 185–199.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (1992). **Official Method of Analysis of AOAC International**, 12th edition, 2, 1115.
- ASGHAR, A., HENRICKSON, R. L. (1982). Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics as collagen in food systems. **Advances in food research**, 28, 231-372.
- BAILEY, A. J., LIGHT, N. D. (1989). **Connective tissue in meat and meat products**. Barking: Elsevier, 355p.
- BARNES, H. A. (1994). Rheology of emulsion – a review. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, 91, 89-95.
- BARNES, H. A., HUTTON, J. F., WALTERS, K. (1989). **An introduction to rheology**. Amsterdam. Elsevier Science Publishers, 199p.
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, 37, 911-917.
- BOKI, K., KAWASAKI, N. (1994). Moisture sorption characteristics of collagen fiber prepared in different acidic pH solutions. **Journal of Colloids and Interface Science**, 164, 364–369.
- BORDERÍAS, A. J., PUDZKI, J. (1985). Nota previa. Estudios preliminares sobre el colágeno de la merluza (*Merluccius merluccius* L.). **Revista de agroquímica y tecnología de alimentos**, 25, 149-154.

- CHEN, J., DICKINSON, E., EDWARDS, M. (1999). Rheology of acid-induced sodium caseinate stabilized emulsion gels. **Journal of Texture Studies**, 30, 377-396.
- CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. (2006). Food protein based material as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, 17, 272-283.
- CORTÉS-MUÑOZ, M., CHEVALIER-LUCIA, D., DUMAY, E. (2009). Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage. **Food Hydrocolloids**, 23, 640–654.
- DATTA, N.; HAYES, M. G.; DEETH, H. C.; KELLY, A. L. (2005). Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. **Journal of Dairy Research**, 72, 393-399.
- DICKINSON, E. (1992). **An introduction to food hydrocolloids**, Oxford, UK: University Press chapter 1.
- DICKINSON, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, 17, 25-39.
- DICKINSON, E. (2006). Colloid science of mixed ingredients. **Soft Matter**, 2, 642-652.
- DICKINSON, E., GOLDING, M., POVEY, J.W. (1997) Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. **Journal of Colloid and Interface Science**, 185, 515-529.
- FLOURY, A., DESRUMAUX, A., AXELOS, M. A.V., LEGRAND, J. (2003). Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. **Journal of Food Engineering**. 58, 227–238

FLOURY, J., DESRUMAUX, A., LARDIÈRES, J. (2000). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 1, 127-134.

FRIESS, W. (1998). Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 45, 113-136.

HAYES, M. G., KELLY, A. L.(2003). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy research**, 70, 297-305.

HILL, S. E. (1996). Emulsions. In G.M. Hall, **Methods of testing protein functionality**, New York: Blackie.

HU, M., MCCLEMENTS, D. J., DECKER, E. A. (2003). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein, and soy protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 1696-1700.

HUMBERT, G.; DRIOU, A.; GUERIN, J.; ALAIS, C. (1980). Effets de l'homogénéisation à haute pression sur les propriétés du lait et son aptitude à la coagulation enzymatique. **Le lait**, 60, 574-594.

HUNTER, R. J. (1993). **Introduction to Modern Colloid Science**, Oxford University Press, Oxford, UK. 338 p.

HUPPERTZ, T., KELLY, A. L., FOX, P. F (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. **International Dairy Journal**, 12, 651-572.

HUPPERTZ, T., FOX, P. F., KELLY, A. L. (2004). Properties of casein in high pressure treated bovine milk. **Food Chemistry**, 87, 103-110.

LI, A., JIA, D., YAO, K. (2009). Amino acid composition and functional properties of collagen polypeptide from Yak (*Bos grunniens*) boné. **LWT - Food Science and Technology** , 42, 945–949.

- LUCASSEN-REYNDERS, E. H. (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. **Food Structure**, 12, 1-12.
- MACOSKO, C. W. (1994). **Rheology: Principles, Measurements and Applications**. VCH Publishers, New York.
- MÁXIMO, G. J., CUNHA, L. R. (2008). Physical properties of collagen derivatives for food applications. **V Jornada Internacional de Proteínas e Colóides Alimentares**. Ital, Campinas-SP, 70.
- MCCLEMENTS, D. J. (2005). Food emulsions: principles, practice, and techniques. Washington: CRC Press.
- MEWIS, J., MACOSKO, C. W. (1994). Suspension rheology. In: **Rheology: Principles, Measurements and Applications**, Macosko, C.W., Ed., VCH Publishers, New York, Chap. 10.
- MONTERO, P., ALVAREZ, C., MARTÍ, M. A., BODERÍAS, A. J. (1995). Plaice skin collagen extraction and functional properties. **Journal of Food Science**, 60, 1-3.
- MONTERO, P., BORDERÍAS, J. (1991). Emulsifying capacity of collagenous material from the muscle and skin of hake *Merluccius merluccius L.* and trout *Salmo irideus Gibb*: effect of pH and NaCl concentration. **Food Chemistry**, 41, 251-67.
- MORR, C. V., GERMAN, B., KINSELLA, J. E., REGENSTEIN, J. M., VANBUREN, J. P.; KILARA, A., LEWIS, B. A., MANGINO, M. E. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, 50, 1715-1718.
- MOZHAEV, V. V., HEREMANS, L., FRANK, J., MASSON, P., BALNY, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 24, 81-91.

- NEKLYUDOV, A. D. (2003). Nutritive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 39, 229-238.
- NEWSTEIN, M. C., WANG, H., BALSARA, N. P., LEFEBVRE, A. A., SHNIDMAN, Y., WATANABE, H., OSAKI, K., SHIKATA, T., NIWA, H., MORISHIMA, Y. (1999) Microstructural changes in a colloidal liquid in the shear thinning and shear thickening regimes. **Journal of Chemical Physics**, 111, 4827.
- OLIJE, J., MORI, F., TODA, J. (2001). Influence of the Molecular-Weight Distribution of Gelatin on Emulsion Stability. **Journal of Colloid and Interface Science** 243, 476– 482.
- OLIVO, R., SHIMOKOMAKI, M. (2002). **Carnes: No caminho da Pesquisa**. 2 ed. Cocal do Sul: IMPRINT, 155p.
- PERRECHIL, F. A. (2008). **Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio e jataí**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.
- PERRIER-CORNET, J. M., MARIE, P., GERVAIS, P. (2005). Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. **Journal of Food Engineering**, 66, 211–217.
- PUGNALONI, L. A., MATIA-MERINO, L., DICKINSON, E. (2005). Microstructure of acid induced caseinate gels containing sucrose: quantification from confocal microscopy and image analysis. **Colloid Surface B**, 42, 211-217.
- RAO, B. R., HENRICKSON, R. L (1983). Food grade hide collagen in bologna effect on functional properties, texture and color. **Journal of Food Quality**, Westport, 6, 1-10.

- ROCHA, G. A. (2009). Produção, caracterização, estabilidade e aplicação de microcápsulas de licopeno. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.
- RODRÍGUEZ, A. (2009). Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. **Food Hydrocolloids**, 23, 1096–1102.
- SANDRA, S., DALGLEISH, D. G. (2005). Effects of ultra high pressure homogenisation and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. **International Dairy Journal**, 15, 1095-1104.
- SATTERLEE, L. D., ZACHARIAH, N. Y. (1973). Utilization of beef and pork skin hidrolizates as a binder or extender in sausages emulsion. **Journal of Food Science**, 38, 268-270.
- STEFFE, J. F. (1996). **Rheology methods in food process engineering**. Michigan: Freman Press, 2^a ed.
- TADROS, T. F. (1994) Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect**, **Amsterdam**, 91, 30-55.
- TADROS, T. F. (2004). Application of rheology for assesment and predction of long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interfaces Science**, **Amsterdam**, 108-109, 227-258.
- TURGEON, S. L., GAUTHIER, S. F., MOLLÉ, D., LÉONIL, J. (1992). Interfacial properties of tryptic peptides of β -lactoglobulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 669-675.

VANAPALLI, S. A., COUPLAND, J. N. (2004). Orthokinetic stability of emulsions. In: **Food Emulsions** 4th ed., Friberg, S., Larsson, K., Sjoblom, J., Eds., Marcel Dekker, New York, NY, Chap. 9.

WALSTRA, P., SMULDERS, I. (1997). In E. Dickinson e B. Bergenstahl (Eds.), **Food colloids: Proteins, lipids and polysaccharides**. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 367-389.

WALSTRA, P. (2003). **Physical Chemistry of Foods**. New York: Marcel Decker. 807 p.

WOLF, K. L., SOBRAL, P. J. A., TELIS, V. R. N. (2009). Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for selfcomposite film production. **Food Hydrocolloids**, 23, 1886–1894.

WULFF-PÉREZ, M., TORCELLO-GÓMEZ, A., GÁLVEZ-RUÍZ, M. J., MARTÍN-ZHANG, J. DUAN, R., KONNO, K. (2009). Characterization of acid-soluble collagen from skin 1 of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, 116, 318-322.